

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



CARACTERIZACIÓN DEL REMANENTE DEL CUERPO MEDIO Y LA REGULACIÓN DE SU HERENCIA

JAVIER CASARES ARIAS

MADRID, 2019

MEMORIA PRESENTADA POR
JAVIER CASARES ARIAS,
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
BIOCIENCIAS MOLECULARES

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MIGUEL ÁNGEL ALONSO LEBRERO

Este trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Biología Molecular.
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
<hr/>	
RESUMEN	25
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	21
<hr/>	
1.- <i>La división celular</i>	
1.1.- Preparativos y segregación del material genético	24
1.2.- Remodelación de la zona central del huso	25
1.3.- El surco de división	25
1.4.- El cuerpo medio	26
1.5.- Maduración del cuerpo medio	27
1.6.- Abscisión	28
2.- <i>La maquinaria ESCRT</i>	
2.1.- Los complejos ESCRT	29
2.2.- Funciones no relacionadas con la citocinesis	31
2.3.- ESCRT durante la citocinesis	33
2.4.- Punto de control de abscisión	35
3.- <i>El remanente del cuerpo medio</i>	
3.1.- Origen y posibles destinos	37
3.2.- Funciones post-mitóticas	38
OBJETIVOS	41
<hr/>	
MATERIALES Y MÉTODOS	45
<hr/>	
1.- <i>Materiales</i>	
1.1.- Anticuerpos	47
1.1.1.- Anticuerpos primarios	
1.1.2.- Anticuerpos secundarios	
1.2.- Reactivos	48
1.3.- Plásmidos	48
1.4.- Oligonucleótidos	50

2.- Métodos	
2.1.- Bacterias	50
2.2.- Cultivos celulares	51
2.3.- Transfección de ADN y ARN de interferencia	51
2.4.- Generación de células con expresión estable	52
2.5.- Inmunoprecipitación	52
2.6.- Electroforesis de proteínas e inmunodetección	52
2.7.- Inmunofluorescencia indirecta	53
2.8.- Microscopía confocal	53
2.9.- Videomicroscopía	54
2.10.- Microscopía correlativa (CLEM)	54
2.11.- Caracterización morfológica del remanente del cuerpo medio	56
2.12.- FRAP	57
2.13.- Ensayo de ciliogénesis	57
2.14.- Análisis estadístico	58
RESULTADOS	59
<hr/>	
1.- La mayoría de los remanentes del cuerpo medio se encuentran en la superficie celular	61
2.- El remanente del cuerpo medio permanece conectado con la membrana plasmática mediante una conexión membranosa	62
3.- Los remanentes del cuerpo medio presentan ciertas características morfológicas comunes	67
4.- La existencia de la conexión restringe el movimiento del remanente del cuerpo medio <i>in vivo</i>	69
5.- El remanente del cuerpo medio tiene propiedades de compartimento celular independiente	71
6.- La maquinaria ESCRT sigue la misma dinámica durante el primer y segundo evento de abscisión	73
7.- La maquinaria ESCRT se distribuye de forma desigual entre ambos lados del remanente	75
8.- La maquinaria ESCRT se concentra en el punto de conexión entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática	77
9.- No existe intercambio de subunidades ESCRT entre el remanente y el cuerpo celular	79
10.- El silenciamiento de CHMP4C acelera el proceso de abscisión en células MDCK	82
11.- La proteína CHMP4C es necesaria para la herencia del remanente del cuerpo medio	83
12.- La proteína CHMP4C es necesaria para la formación del cilio primario en células MDCK	86

<i>1.- El remanente del cuerpo medio permanece conectado a la membrana plasmática en células MDCK</i>	
1.1.- El remanente del cuerpo medio, un orgánulo de herencia asimétrica	92
1.2.- El remanente del cuerpo medio se encuentra sobre la membrana apical en células MDCK	92
1.3.- El remanente del cuerpo medio está conectado físicamente con la membrana plasmática	93
1.4.- Los remanentes del cuerpo medio presentan rasgos morfológicos comunes	95
 <i>2.- La conexión remanente-membrana plasmática tiene su origen en el proceso de abscisión</i>	
2.1.- La maquinaria ESCRT sigue la misma dinámica durante ambos eventos de abscisión	96
2.2.- Una fracción de los polímeros de ESCRT observados en los remanentes del cuerpo medio coincide con la conexión con la membrana plasmática	97
2.3.- El remanente del cuerpo medio se comporta como un compartimento celular independiente	98
 <i>3.- La proteína CHMP4C del complejo ESCRT regula la integridad de la conexión remanente-membrana plasmática</i>	
3.1.- La proteína CHMP4C es necesaria para la herencia del remanente del cuerpo medio	100
3.2.- La capacidad de activar el punto de control de abscisión es crucial para el papel de CHMP4C como regulador del proceso de herencia del remanente	101
3.3.- Los defectos en la herencia del remanente del cuerpo medio afectan al proceso de ciliogénesis primaria en células MDCK	102
 <i>4.- Consideraciones finales</i>	102
 CONCLUSIONES	105
 BIBLIOGRAFÍA	111
 ANEXO: Artículos	121

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
ALIX: del inglés *apoptosis-linked gene 2-interacting protein x*
AMIS: del inglés *apical membrane initiation site*
ANCHR: del inglés *abscission/nocut checkpoint regulator*
ARN: ácido ribonucleico
BSA: del inglés *bovine serum albumin*
CEP-55: del inglés *centrosomal protein of 55 kDa*
CHMP: del inglés *charged multivesicular body protein*
CLEM: del inglés *correlative light and electron microscopy*
CLK: del inglés *cdc-like kinases*
CYK-4: del inglés *cytokinesis defect protein 4*
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM: del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*
ECL: del inglés *enhanced chemi-luminiscence*
ECT2: del inglés *epithelial cell transforming 2*
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGFP: del inglés *enhanced green fluorescent protein*
EMS: del inglés *endomesodermal precursor*
ESCRT: del inglés *endosomal sorting complex required for transport*
FBS: del inglés *fetal bovine serum*
FIP3: del inglés *rab11-family interacting protein 3*
FRAP: del inglés *fluorescence recovery after photobleaching*
GAPS: del inglés *GTPase-activating proteins*
GDP: guanosín difosfato
GEFS: del inglés *guanine nucleotide exchange factors*
GTP: guanosín trifosfato
HEK: del inglés *human embrionic kidney*
HMDS: hexametildisilazano
HRP: del inglés *horseradish peroxidase*
IF: inmunofluorescencia
IQR: del inglés *interquartile range*
kDa: kilodalton
LB: medio de cultivos Luria-Bertani
MDCK: del inglés *Madin-Darby canine kidney*
MEM: del inglés *minimum essential media*

MICAL1: del inglés *microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1*

MIN: minuto

MKLP1: del inglés *mitotic kinesin-like protein 1*

NA: del inglés *numerical apperture*

OCRL: del inglés *oculocerebrorenal syndrome of lowe*

PA: picoamperio

PBS: del inglés *phosphate buffered saline*

PEI: polietilenimina

PKC: del inglés *protein kinase c*

PRC1: del inglés *protein regulator of cytokinesis 1*

PVDF: del inglés *polyvinylidene fluoride*

RNA: del inglés *ribonucleic acid*

SEM: del inglés *scanning electron microscopy*

SEM: del inglés *standard error of the mean*

shRNA: del inglés *small hairpin RNA*

SIM: del inglés *structured illumination microscopy*

siRNA: del inglés *small interfering RNA*

SD: del inglés *standard deviation*

SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*

SOC: del inglés *super optimal broth with catabolite repression*

STORM: del inglés *stochastic optical reconstruction microscopy*

t: tiempo

TSG101: del inglés *tumor susceptibility gene 101*

ULK3: del inglés *unc-51 like kinase 3*

UV: ultravioleta

VPS4: del inglés *vacuolar protein sorting factor 4*

WB: del inglés *western blot*

RESUMEN

El cuerpo medio, un puente membranoso formado por haces compactos de microtúbulos, mantiene conectadas a las células hijas durante las últimas fases de la división celular. El corte de esta estructura durante el proceso de abscisión pone fin a la citocinesis separando físicamente ambas células. Mas allá de su papel estructural, el cuerpo medio es responsable del reclutamiento y regulación de la maquinaria de abscisión, entre la que destacan las proteínas del complejo ESCRT. Una vez escindido, parte del cuerpo medio puede ser heredado por una de las células hijas en forma de remanente. Considerado durante largo tiempo una estructura vestigial, en la última década se han acumulado evidencias de las importantes funciones post-mitóticas de esta estructura. A pesar del creciente interés en estas funciones, la relación entre el remanente del cuerpo medio y la célula que lo hereda no ha sido investigada en profundidad. El objetivo de esta tesis es caracterizar el remanente del cuerpo medio y determinar los mecanismos que median su herencia y posterior retención tras la división celular.

En análisis de la morfología de los remanentes mediante microscopía correlativa confocal y electrónica de barrido de ultra-alta resolución nos ha permitido identificar una serie de características morfológicas comunes a estas estructuras. Entre ellas, destaca la existencia de una conexión membranosa que une la mayoría de los remanentes con la membrana plasmática de las células epiteliales MDCK. El patrón de movimiento de estas estructuras en células vivas es consistente con la existencia de esta conexión, señalándola como potencial responsable de la retención por una de las células hijas. El punto de origen de la conexión, unido a la presencia de proteínas del complejo ESCRT en la misma, sugieren que la conexión remanente-membrana plasmática tiene su origen en un evento de abscisión incompleto. La subunidad CHMP4C del complejo ESCRT-III, uno de los principales reguladores del proceso de abscisión, está presente en la conexión. La falta de esta proteína, o su incapacidad de activar el punto de control de abscisión, acelera el proceso de citocinesis, y tiene como consecuencia la pérdida de los remanentes del cuerpo medio. De acuerdo con el papel propuesto para esta estructura en el proceso de ciliogénesis, la reducción de los niveles de la proteína CHMP4C disminuye drásticamente la capacidad de formación de cilios primarios en células MDCK.

En resumen, la herencia del remanente del cuerpo medio se debe a la existencia de una conexión membranosa entre esta estructura y la membrana plasmática. El origen de dicha conexión se encuentra en un evento de abscisión incompleto que depende de la capacidad de CHMP4C de activar el punto de control de abscisión.

The midbody is a membranous bridge consisting of densely packed microtubule bundles that keeps the two daughter cells connected during the final stages of cell division. The cleavage of this structure through the abscission process ends cytokinesis by physically separating the cells. Beyond its structural role, the midbody is responsible for recruiting and regulating the abscission machinery, mainly the ESCRT complex. Once cleaved, part of the midbody can be inherited by one of the daughter cells in the form of a remnant. Considered for long time to be vestigial structures, in recent years, remnants have been shown to have important post-mitotic functions. The objective of this thesis is to determine the mechanisms that mediate midbody remnant inheritance and retention after cell division.

The analysis by correlative confocal microscopy and ultra-high-resolution scanning electron microscopy has allowed us to identify a series of prevalent morphological features present in midbody remnants. Of these, the presence of a membranous stalk connecting most of the midbody remnants to the apical membrane of MDCK cells is of particular note. The pattern of movement observed for the remnants in living cells is consistent with the existence of the connection, which is responsible for remnant inheritance. The localization of the connection, and the presence of ESCRT proteins on it, points to an incomplete abscission event as being the most likely cause of its biogenesis. We found the ESCRT-III complex subunit CHMP4C, which is one of the main regulators of abscission, at the connection. The knockdown of CHMP4C, or the loss of its ability to trigger the abscission checkpoint, accelerates cytokinesis and results in remnant loss. According to the proposed role of the remnant in primary ciliogenesis by MDCK cells, a drop in the levels of CHMP4C dramatically reduces the ability to assemble a primary cilium.

In short, midbody remnant inheritance is caused by the existence of a membranous connection between this structure and the plasma membrane. The connection appears to form through an incomplete abscission event that depends on the ability of CHMP4C to activate the abscission checkpoint.

INTRODUCCIÓN

El proceso de división celular tiene como resultado la creación de dos células “hijas” genéticamente idénticas a partir de una célula “madre”. Si bien la correcta segregación del material genético entre las células resultantes (mitosis) es clave en este proceso, la separación física de las mismas (citocinesis) es necesaria para la generación de dos entidades independientes. A finales del siglo XIX, el biólogo alemán Walther Flemming describió la existencia de una estructura que, a modo de puente, conectaba las células hijas durante el proceso de división (Flemming, 1891). Conocida posteriormente como cuerpo medio, fue ignorada o considerada poco más que una estructura transitoria de poco interés hasta finales de la década de 1960 (Buck y Tisdale, 1962). Las primeras observaciones mediante videomicroscopía determinaron que las células hijas permanecen conectadas por el cuerpo medio durante horas tras la reformación de sus núcleos, posponiendo el final de la división celular mucho más allá de la mitosis.

En estos estudios, Breck Bryers ya observó que una de las células hijas “heredaba” parte de esta estructura tras la división (Byers y Abramson, 1968). No fue hasta la primera década de los 2000 cuando los esfuerzos se centraron en determinar las posibles funciones post-mitóticas del llamado remanente del cuerpo medio (Chen et al., 2013). Aunque hoy en día conocemos su composición y algunas de sus funciones tras la división celular, la morfología del remanente del cuerpo medio, y sobre todo su relación con la célula que lo hereda, son prácticamente desconocidas. Para llevar nuestra comprensión de los papeles post-mitóticos del remanente del cuerpo medio al siguiente nivel, debemos primero arrojar luz sobre estos aspectos. En este trabajo hemos estudiado en detalle esta estructura, así como su origen en el proceso de abscisión, para tratar de identificar los mecanismos que median su retención, así como posibles reguladores de los mismos.

1.- La división celular

1.1.- Preparativos y segregación del material genético

La división celular supone una total reorganización de las estructuras celulares con el objetivo de asegurar el correcto reparto del material genético entre las dos células hijas (mitosis), así como su posterior separación física (citocinesis). Antes de iniciar el proceso de división la célula duplica su genoma, aumenta de volumen y genera copias de aquellas estructuras que serán necesarias más adelante en el proceso, como los centrosomas.

La mitosis comienza con la condensación del material genético dentro del núcleo, dando lugar a los cromosomas. Durante esta primera etapa, la profase, una red de microtúbulos denominada huso mitótico se establece en el citoplasma entre ambos centrosomas (Petry, 2016). La posterior desorganización de la envoltura nuclear permite que los cromosomas comiencen a asociarse con las fibras del huso durante la prometafase (Fernandez-Alvarez y Cooper, 2017) (Fig. I-1A). El movimiento de los cromosomas hacia el plano ecuatorial de la célula marca el inicio de la metafase, que concluye con todos los cromosomas firmemente unidos a los microtúbulos del huso formando la placa metafásica (Fig. I-1B).

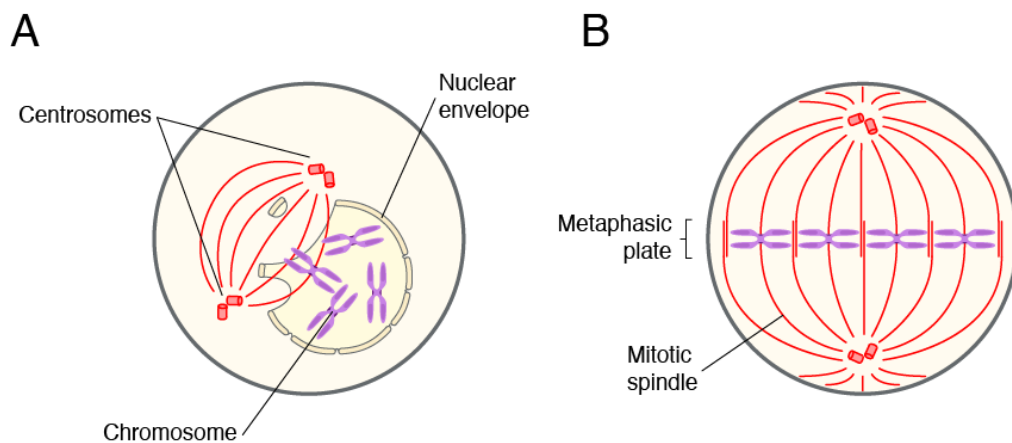


Figura I-1. Fases iniciales de la mitosis. Representación de la prometafase (A) y metafase (B)

El paso crucial de la mitosis, la separación de las cromátidas hermanas, tiene lugar durante la anafase (Fig. I-2A). Las proteínas que las mantenían unidas se degradan, y el acortamiento de los microtúbulos anclados a las cromátidas las acercan a las zonas polares del huso. La elongación de los microtúbulos interpolares aumenta la distancia entre los centrosomas, elongando la célula y separando aún más ambos grupos de cromátidas (McIntosh, 2017; Vukusic et al., 2019). Tras segregarse el material genético entre

ambos polos de la célula, durante la telofase se revierten los procesos del inicio de la mitosis. Los dos grupos de cromátidas son rodeados por la envoltura nuclear y comienzan a descondensarse (Fig. I-2B) (Schellhaus et al., 2016).

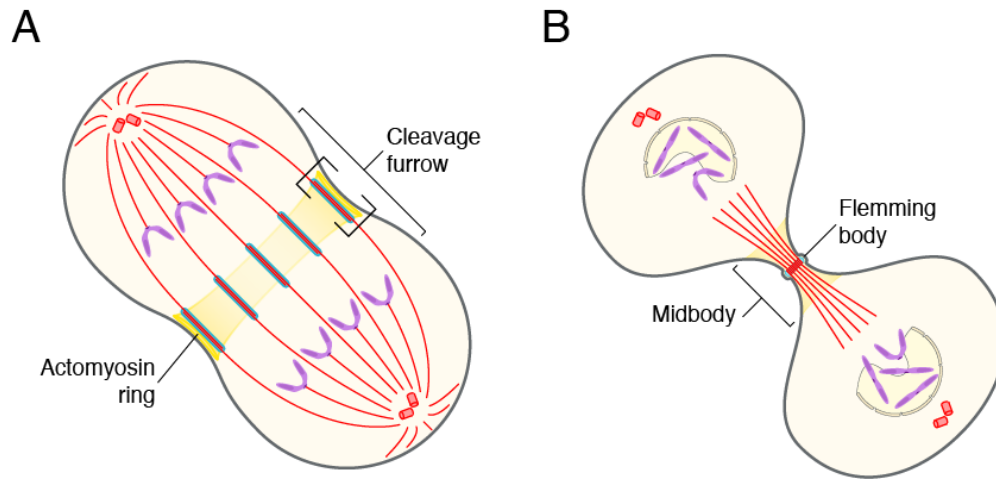


Figura I-2. Fases tardías de la mitosis. Representación de la anafase (A) y telofase (B)

1.2.- Remodelación de la zona central del huso

Salvo excepciones, la segregación del material genético durante la mitosis está unida al reparto del citoplasma entre ambas células hijas y su separación física: la citocinesis. Este proceso se inicia durante la separación de las cromátidas hermanas en la anafase con la remodelación de la zona central del huso mitótico. En la región ocupada inicialmente por la placa metafásica, los microtúbulos interpolares antiparalelos se solapan, asociándose íntimamente entre ellos mediante complejos multiprotéicos. Entre las proteínas responsables de este proceso destacan PRC1 y el complejo centralspindlina (compuesto por las proteínas MKLP1 y CYK-4) (White y Glotzer, 2012). La formación de estos complejos inhibe la elongación de los microtúbulos en la zona central del huso y los estabiliza.

1.3.- El surco de división

En células animales, el reparto del citoplasma comienza con la formación de un anillo cortical de actomiosina en el plano una vez ocupado por la placa metafásica. La localización precisa del plano de división es fundamental para asegurar que el reparto del material genético y de los componentes del citoplasma entre ambas células hijas sea el correcto, y viene determinada por la actividad de la GTPasa pequeña RhoA en las diferentes zonas del huso (Basant y Glotzer, 2018; Pollard y O'Shaughnessy, 2019). Las GTPasas pequeñas pueden encontrarse unidas a guanosín trifosfato (GTP) o difosfato (GDP), siendo capaces de interactuar con sus efectores únicamente en su forma unida a

GTP. La asociación de estas proteínas con sus GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) promueve la liberación del GDP, permitiendo su intercambio por GTP y por tanto su activación. Por el contrario, su unión a GAPs (*GTPase Activating Proteins*) cataliza la conversión del GTP en GDP, lo que inactiva la proteína.

La asociación de ECT2, una GEF de RhoA, con la subunidad CYK-4 del complejo centralspindlina promueve la activación de RhoA, y por tanto la polimerización de actina, específicamente en la región ecuatorial (Fig. I-3). La presencia de microtúbulos dinámicos en las zonas polares del huso, por el contrario, inhibe la actividad de RhoA en estas zonas (Mishima, 2016). Este mecanismo redundante restringe espacio-temporalmente la polimerización de actina a la región ecuatorial durante la anafase. Una vez activada en el córtex de la zona ecuatorial, RhoA promueve la polimerización de un anillo de filamentos de actina no ramificados, así como el reclutamiento de miosina IIA a los mismos (Spira et al., 2017). La constricción del anillo de actomiosina, íntimamente asociado a la membrana plasmática, desencadena la aparición de la constricción primaria, un estrechamiento de la región ecuatorial (Fig. I-2A). La retracción progresiva del córtex da lugar al surco de división, iniciando el reparto del citoplasma entre lo que serán las dos células hijas.

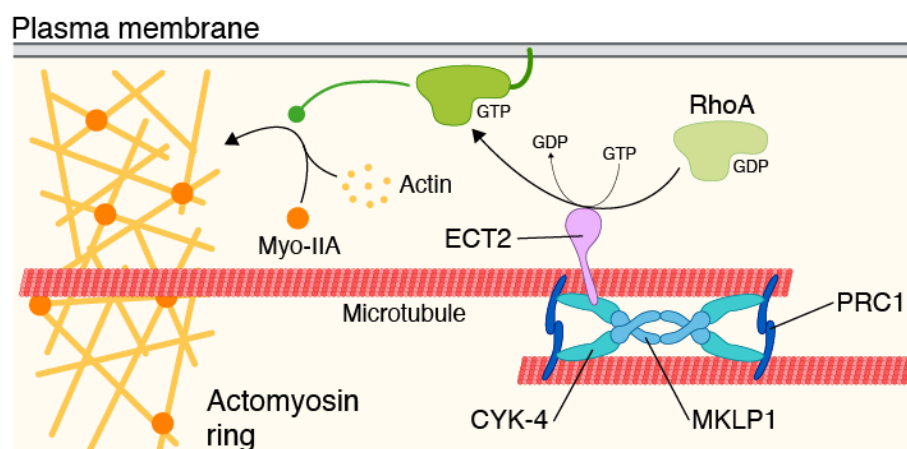


Figura I-3. Cascada de señalización implicada en la aparición del surco de división. Las proteínas asociadas a la zona central del huso determinan la regulación espacio-temporal de la activación de RhoA.

1.4.- El cuerpo medio

La constricción del surco de división avanza hasta alcanzar un diámetro de 1-2 μm , dando lugar al cuerpo medio. Esta estructura, a modo de puente intercelular, mantiene conectadas las células hijas tras la segregación del material cromosómico. El cuerpo medio está formado por haces compactos de microtúbulos (derivados del huso mitótico) rodeados de membrana plasmática. Su característica morfológica más

distintiva es la presencia del cuerpo de Flemming, una región electrondensa engrosada situada en su centro (Mullins y Bieseke, 1977). En ella se encuentran los complejos que estabilizan los microtúbulos derivados de la zona central del huso y se establecen las interacciones con la membrana plasmática que mantienen la integridad de la estructura (Hu et al., 2012). Esta región se encuentra flanqueada por dos “brazos”, formados por haces de microtúbulos paralelos, que la conectan a sendas células hijas (Fig. I-2B).

1.5.- Maduración del cuerpo medio

Tras el proceso de constricción, el cuerpo medio sufre una serie de transformaciones que lo capacitan para orquestar los últimos pasos de la citocinesis. La red cortical de actomiosina responsable de la aparición del surco de división supone ahora un impedimento físico al avance del proceso. Su eliminación depende de la actividad de RhoA y sus proteínas asociadas, y se logra mediante inhibición directa y cambios en la composición de la membrana plasmática.

El tráfico vesicular polarizado, fundamental para la división celular en organismos vegetales, también juega un papel en la citocinesis animal. Una vez establecido el cuerpo medio, vesículas derivadas del aparato de Golgi y otros compartimentos endosomales se acumulan en las regiones adyacentes a la estructura (Fremont y Echard, 2018). Dos poblaciones de vesículas, diferenciadas por su contenido en Rab GTPasas, contribuyen al proceso de maduración (Fig. I-4). Las vesículas positivas para Rab11 y FIP3 inhiben la polimerización de actina dirigiendo la proteína p50RhoGAP hacia el cuerpo medio (Schiel et al., 2012). Por otra parte, la población positiva para Rab35 genera cambios en la composición de la membrana plasmática del cuerpo medio. Durante el ensamblaje y constricción del surco de división, la membrana del cuerpo medio está enriquecida en fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato o PtdIns(4,5)P₂, lo que promueve la acumulación de RhoA y proteínas asociadas en la región ecuatorial (Brill et al., 2011). La PtdIns(4,5)P₂ 5-fosfatasa OCRL (*Oculocreborenal syndrome of Lowe 1*), proporcionada por las vesículas Rab35 positivas, hidroliza este lípido (Dambournet et al., 2011). La llegada de vesículas Rab11-FIP3 y Rab35-OCRL al cuerpo medio, junto con la activación localizada del complejo PKC ϵ /14-3-3 (Saurin et al., 2008), causan una disminución en la actividad de RhoA en la estructura, lo que inhibe la formación de polímeros de actina. La eliminación de los filamentos preexistentes es mediada por la oxidorreductasa MICAL1, que se activa en el cuerpo medio también de forma dependiente de Rab35 (Fremont et al., 2017). La oxidación de residuos de metionina en las subunidades de actina por parte de esta enzima desestabiliza los filamentos preexistentes promoviendo su eliminación.

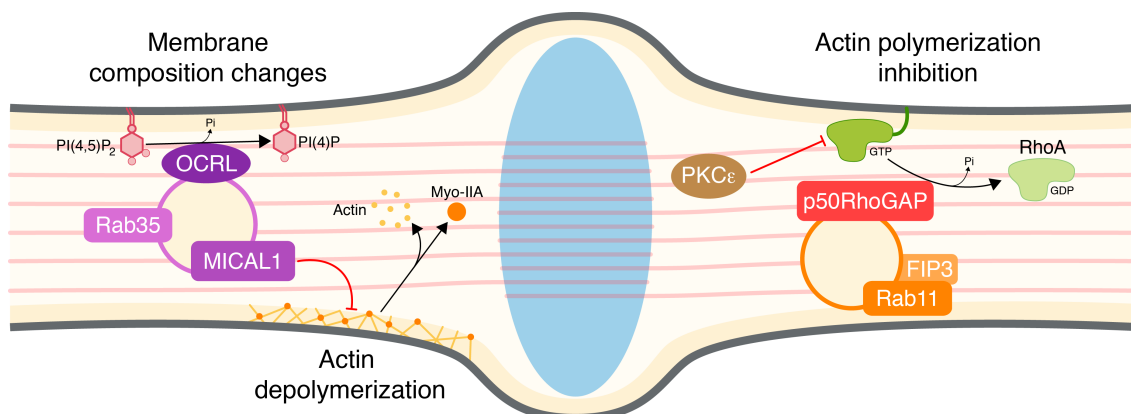


Figura I-4. Procesos implicados en la maduración del cuerpo medio. Las vesículas positivas para Rab35 (izquierda) transportan la proteína OCRL, que produce cambios en la composición de la membrana, y la oxidorreductasa MICAL1, que desencadena la despolimerización de la actina cortical. Las vesículas positivas para Rab11 y FIP3 transportan la proteína p50RhoGAP que, junto con la activación de PKCε, inactiva a RhoA e inhibe la polimerización de actina.

Recientemente se ha propuesto un papel adicional para los filamentos de actina previo a su desaparición. La formación de dos pequeños anillos contráctiles a ambos lados del cuerpo de Flemming, dependientes en este caso de miosina IIB y C, contribuiría al estrechamiento de la estructura (Dema et al., 2018; Wang et al., 2019). Esto, junto con la eliminación la red cortical de actina, la disminución en la actividad de RhoA y el aporte de membranas mediante tráfico vesicular polarizado, contribuye a la reducción del diámetro de los brazos del cuerpo medio que precede al último paso de la citocinesis: la abscisión.

1.6.- Abscisión

Una vez el cuerpo medio ha alcanzado su diámetro mínimo comienza la última fase de la citocinesis, la abscisión, en la que se produce la separación física de las células hijas. Los primeros estudios mediante microscopía electrónica a finales de la década de 1970 mostraron la aparición de un estrechamiento junto al cuerpo de Flemming, denominado constricción secundaria, como paso previo a la escisión (Fig. I-5A) (Mullins y Bieseke, 1977). Observaciones posteriores mediante tomografía electrónica identificaron fibras de 17 nm espaciadas regularmente desde el cuerpo de Flemming hasta el sitio de máxima constricción (Fig. I-5B) (Guizetti et al., 2011). Si bien aún no existe una confirmación directa, todas las evidencias disponibles señalan a la maquinaria ESCRT como componente principal de estos filamentos.

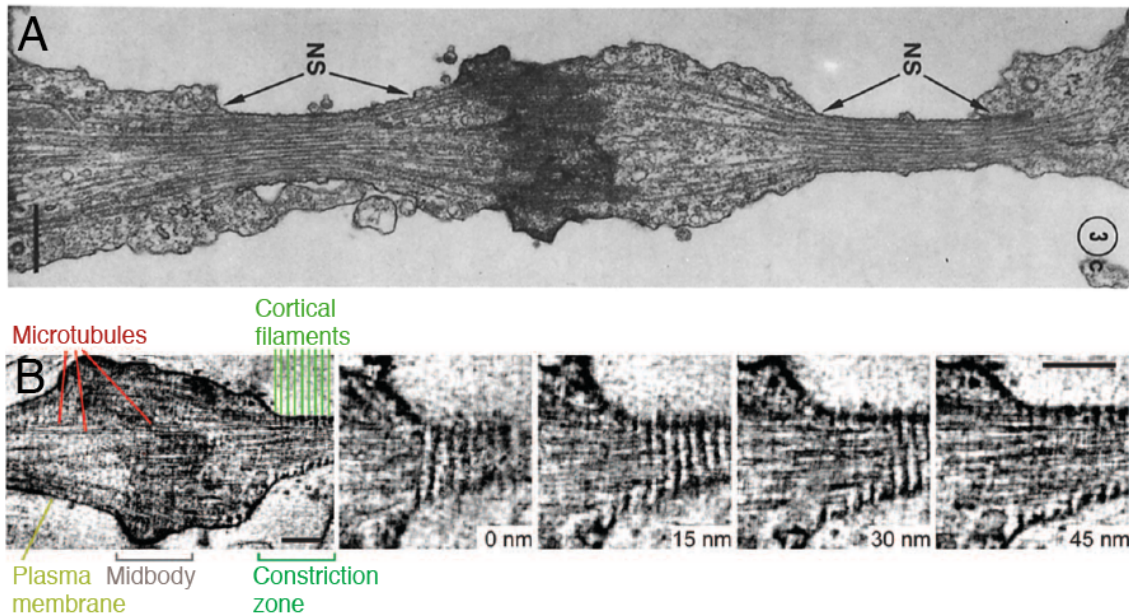


Figura I-5. Constricción secundaria observada mediante microscopía electrónica. (A) Observación de constricciones secundarias en células D-98S mediante microscopía de transmisión, las flechas señalan las constricciones. (B) Tomografía electrónica que muestra los filamentos de 17 nm. (A) Se ha extraído de Mullins y Bisele (1977), (B) de Guizetti et al. (2011).

2.- La maquinaria ESCRT

2.1.- Los complejos ESCRT

La maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) comprende un grupo de proteínas evolutivamente conservadas implicadas en el remodelado de membranas (Gatta y Carlton, 2019). Si bien se suele hablar de “maquinaria” de forma general, ésta se encuentra formada por cuatro complejos (ESCRT-0, I, II y III) y un número creciente de proteínas asociadas (Fig. I-6).

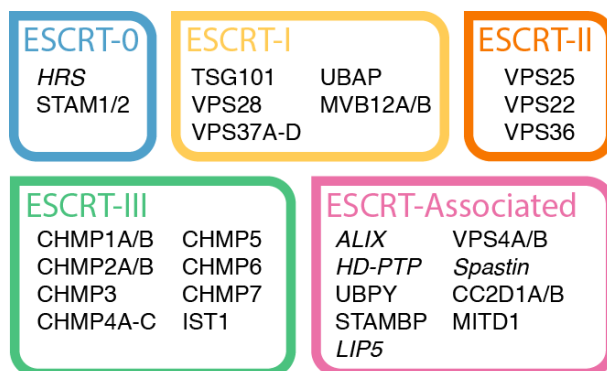


Figura I-6. Las proteínas de la maquinaria ESCRT pueden ser agrupadas en complejos. Se indican los nombres de los genes codificantes de las proteínas ESCRT humanas y de sus proteínas asociadas. Los nombres en cursiva corresponden a los alias comúnmente utilizados.

La localización subcelular de la maquinaria es determinada mediante varias rutas paralelas, algunas redundantes, que dependen del contexto celular (Schoneberg et al., 2017) (Fig. I-7). La denominada “ruta canónica” de ensamblaje de la maquinaria ESCRT comienza con el reclutamiento de los complejos ESCRT-I y ESCRT-II a la membrana diana por el complejo ESCRT-0. Estos tres componentes determinan el lugar de reclutamiento del complejo ESCRT-III, formado por subunidades denominadas CHMPs (*Charged multivesicular bodies proteins*). Capaces de formar filamentos espirales, tubulares y cónicos, las CHMPs están involucradas directamente en el remodelado y la escisión de membranas (Hanson et al., 2008). En la ruta canónica, su reclutamiento comienza por la unión de la subunidad CHMP6 al complejo ESCRT-II, sirviendo de inicio para la formación del polímero (Lee et al., 2015). El mecanismo exacto por el que los polímeros de ESCRT-III llevan a cabo la deformación y fusión de membranas sigue siendo objeto de debate. Aunque se han propuesto multitud de modelos (Chiaruttini et al., 2015; Schoneberg et al., 2017), hay evidencias crecientes de que la polimerización conjunta de varios miembros del complejo ESCRT-III es necesaria para el proceso (Chiaruttini y Roux, 2017).

Aunque se han descrito multitud de proteínas asociadas a la maquinaria ESCRT, entre ellas destaca el único componente de la maquinaria que consume energía: la AAA-ATPasa VPS4. Responsable tanto de la despolimerización como del remodelado de filamentos de ESCRT-III, VPS4 está implicada en el estrechamiento de los polímeros previo a la escisión de membranas y es necesaria para todos los eventos ESCRT-dependientes (Maity et al., 2019; Schoneberg et al., 2018).

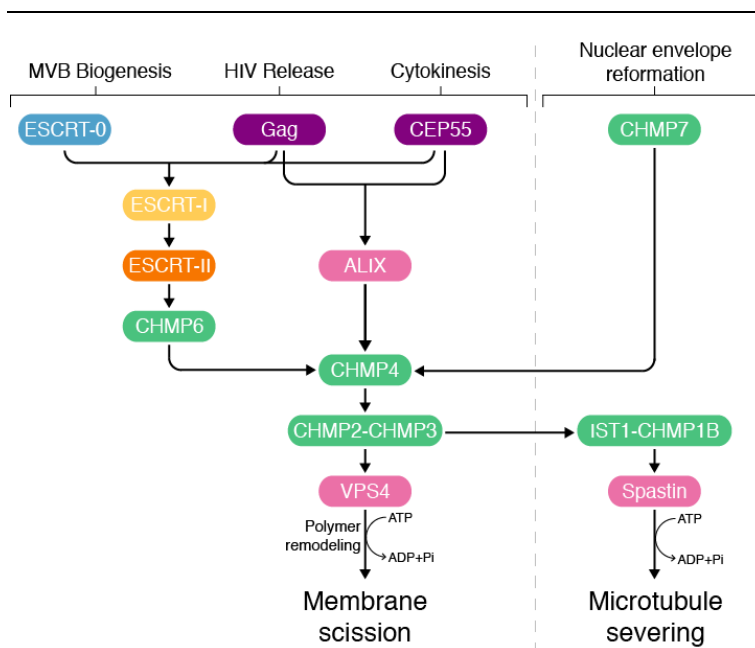


Figura I-7. Rutas de reclutamiento de la maquinaria ESCRT. Esquema de las tres vías de reclutamiento de la maquinaria ESCRT implicadas en los procesos indicados. Los distintos componentes aparecen coloreados según el complejo ESCRT al que pertenezcan. Adaptado de Schöneberg et al. (2016).

2.2.- Funciones no relacionadas con la citocinesis

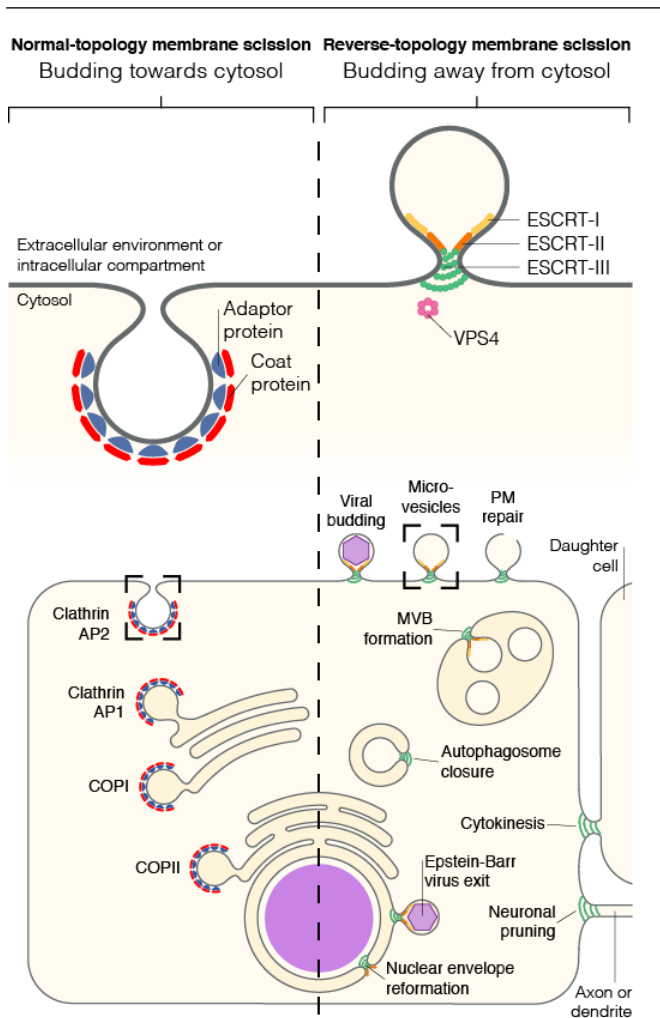
Descubierta por su papel en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares (Katzmann et al., 2001), hoy sabemos que la maquinaria ESCRT media la deformación y posterior escisión de membranas biológicas desde el citoplasma (topología “inversa”) en multitud de procesos celulares (Fig. I-8).

Durante la biogénesis de los cuerpos multivesiculares la maquinaria ESCRT cataliza la invaginación de la membrana endosomal y la escisión del “cuello” que se forma, dando lugar a una vesícula intraluminal (Piper y Katzmann, 2007). Estos orgánulos pueden fusionarse con lisosomas, lo que conlleva la degradación de su contenido, o bien con la membrana plasmática, liberando las vesículas intraluminales al medio extracelular en forma de exosomas. Otro tipo de vesículas extracelulares, los ectosomas, se generan también de forma ESCRT-dependiente mediante gemación directa de la membrana plasmática. Se cree que este mecanismo es utilizado por la célula para reparar rupturas de la membrana plasmática, deshaciéndose de la lesión incluyéndola en un ectosoma (Jimenez et al., 2014). Algunos virus se sirven de este mecanismo para liberarse de la célula infectada. En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana existe una vía redundante para el reclutamiento de la maquinaria que es independiente del complejo ESCRT-II (Martin-Serrano et al., 2003). La proteína viral gag recluta al adaptador ALIX, que se une directamente a la subunidad CHMP4 del complejo ESCRT-III iniciando la formación del polímero que cataliza la gemación viral (Martin-Serrano y Marsh, 2007).

La capacidad del complejo ESCRT no solo de remodelar, sino de unirse a la cara interna de membranas biológicas deformadas le permite llevar a cabo funciones más allá de catalizar procesos de gemación. En las últimas fases de la reformación de la envoltura nuclear tras la mitosis, la presencia de microtúbulos del huso genera pequeños poros que han de cerrarse para asegurar la separación de núcleo y citoplasma. La subunidad CHMP7, una proteína híbrida ESCRT-II/ESCRT-III, actúa como adaptador para dirigir la maquinaria ESCRT a estos sitios bajo el control de la proteína asociada CC2D1B (Gu et al., 2017; Olmos et al., 2015; Ventimiglia et al., 2018). El complejo ESCRT-III, a través de la subunidad IST1, recluta a continuación la enzima despolimerizador de microtúbulos Espastina, coordinando la eliminación de éstos con el cierre de la envoltura (Connell et al., 2009; Vietri et al., 2015). Aún existen muchos interrogantes respecto a las funciones de la maquinaria ESCRT en el núcleo. Múltiples evidencias señalan a la maquinaria como necesaria para la translocación de los virus Epstein-Barr y herpes simplex tipo I a través de la envoltura nuclear. La inhibición de la maquinaria ESCRT

provoca la expansión de la membrana nuclear interna, lo que sugiere además un papel en el remodelado de esta estructura (Arii et al., 2018).

El desarrollo del sistema nervioso central en mamíferos e invertebrados requiere de la remodelación activa de las conexiones neuronales. Axones y dendritas se crean continuamente, para ser posteriormente eliminados en un proceso denominado “poda neuronal”. Varios componentes del complejo ESCRT han sido identificados como reguladores de este proceso en *Drosophila melanogaster* mediante su intervención en el reciclaje de receptores (Loncle et al., 2015). Las similitudes topológicas entre las deformaciones de membrana requeridas para la poda neuronal y otros procesos mediados por ESCRT sugiere un papel directo para la maquinaria en el proceso de escisión. En el sistema nervioso maduro, la membrana postsináptica de las sinapsis excitatorias forma pequeñas protrusiones con forma de hongo denominadas espinas dendríticas. El mantenimiento de estas estructuras ha sido relacionado con la presencia



de polímeros estables de ESCRT-III asociados íntimamente a la membrana plasmática (Chassefeyre et al., 2015). En los últimos años se han identificado funciones de la maquinaria ESCRT que no dependen de su capacidad de remodelar membranas. La subunidad CHMP4C del complejo ESCRT-III, por ejemplo, favorece la unión de los microtúbulos del huso a los cinetocoros durante la prometáfase (Petsalaki y Zachos, 2018). La actividad catalítica de VPS4, pero no el complejo ESCRT-III, regula el mantenimiento de los niveles de gamma-tubulina en el centrosoma, algo necesario para la polimerización de microtúbulos y el posicionamiento de la estructura (Morita et al., 2010; Ott et al., 2018).

Figura I-8. Ejemplos de procesos que requieren el remodelado de membranas. A la izquierda se muestran ejemplos de procesos de topología “normal”, en los que la vesícula es generada hacia el citosol. A la derecha se encuentran los procesos de topología “inversa”, que dan lugar a una vesícula en el medio extracelular o en el interior de otro compartimento celular. Entre estos últimos se encuentran la formación de vesículas a partir de la membrana plasmática que median la gemación viral, la formación de microvesículas y los procesos de reparación de rupturas de membrana. Otros ejemplos son la formación de vesículas intraluminales en los cuerpos multivesiculares, el cierre de autofagosomas, la salida del virus Epstein-Barr del núcleo, la abscisión de membranas durante la citocinesis, así como la reformación de la envoltura nuclear y la poda neuronal. Adaptado de Schöneberg et al. (2016).

La maquinaria ESCRT actúa como “navaja suiza” en lo que remodelado de membranas se refiere. Sus múltiples complejos y vías redundantes de reclutamiento, junto con una cohorte de proteínas asociadas disponibles, permite adaptar la maquinaria ESCRT a los requerimientos de multitud de procesos celulares. Un rasgo común a todos ellos es su escala, que se produce entre membranas separadas por 25-50 nm. Para llevar a cabo el proceso de abscisión que pone fin a la citocinesis, sin embargo, la maquinaria ESCRT debe trabajar a una escala diferente.

2.3.- ESCRT durante la citocinesis

El proceso de abscisión comienza con el reclutamiento de la maquinaria ESCRT en el cuerpo de Flemming (Fig. I-9A) (Elia et al., 2011). Al igual que en algunas de las funciones de ESCRT ya mencionadas, la maquinaria puede ser reclutada mediante la ruta canónica o con la mediación de un adaptador específico. En ambos casos, el proceso se inicia con la unión de la proteína CEP55 a la subunidad MKLP1 del complejo centralspindlina presente en el cuerpo de Flemming (Zhao et al., 2006). Una vez más, las proteínas derivadas de la zona central del huso mitótico son en última instancia las responsables de determinar la localización de un evento clave de la citocinesis. Mediante su interacción con CEP55, las proteínas Tsg101 (componente del complejo ESCRT-I) y ALIX, reclutan al complejo ESCRT-III e inician el proceso de constricción (Fig. I-7) (Christ et al., 2016). Otras proteínas pueden contribuir también al reclutamiento de la maquinaria ESCRT al cuerpo de Flemming. Así, se ha observado que la proteína Septina 9 colabora con Tsg101 en esta labor (Karasmanis et al., 2019).

Debido a la disposición antiparalela de los microtúbulos y a la presencia de complejos que los estabilizan, el cuerpo de Flemming es probablemente demasiado denso como para que la abscisión suceda en esta zona del cuerpo medio. La separación física de las células hijas tiene lugar en la llamada constricción secundaria, una región del brazo del cuerpo medio a 0,6-1 μm del cuerpo de Flemming (Mullins y Bieseke, 1977). Aunque recientemente se ha propuesto un papel para la actina en las últimas fases de la citocinesis (Wang et al., 2019), todas las evidencias señalan a la maquinaria ESCRT como

indispensable para la aparición de la constricción secundaria. Estudios mediante tomografía electrónica y de rayos X han demostrado la existencia de filamentos helicoidales de 17 nm de diámetro íntimamente asociados con la membrana plasmática en el sitio de abscisión (Sherman et al., 2016). La formación de estos polímeros, así como la aparición de la propia constricción, requiere de la subunidad CHMP2A del complejo ESCRT-III (Guizetti et al., 2011). Aunque aún no se ha podido atribuir la naturaleza de estos filamentos inequívocamente a la maquinaria ESCRT, existen varias evidencias que sostienen esta hipótesis. En primer lugar, varios componentes del complejo ESCRT-III han sido observados mediante videomicroscopía siendo reclutados a la constricción secundaria en los momentos previos a la abscisión en células vivas (Elia et al., 2011). Otra serie de observaciones mediante microscopía confocal de super-resolución han caracterizado filamentos helicoidales de ESCRT-III que se asemejan a los filamentos de 17 nm antes mencionados (Goliand et al., 2018).

Los modelos más recientes para la aparición de la constricción secundaria comienzan con la formación del polímero helicoidal antes mencionado a partir de la estructura anular que flanquea el cuerpo de Flemming (Fig. I-9B). Debido a su asociación íntima con la membrana plasmática, la reducción progresiva en el diámetro del polímero de ESCRT-III mediaría la constricción del brazo del cuerpo medio. Si bien los polímeros helicoidales son estructuras recurrentes en los sistemas biológicos (F-actina, microtúbulos, cápsides virales e incluso algunas enzimas forman estas estructuras), los polímeros de ESCRT-III observados durante la abscisión tienen una característica poco común: su diámetro irregular. La copolimerización de proteínas con diferentes “radios de curvatura”, ya sea de forma secuencial o mediante el intercambio de subunidades, explicaría la formación de un polímero compatible con lo observado durante la abscisión (Chiaruttini y Roux, 2017). Los experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) han demostrado que el polímero de ESCRT-III se mantiene dinámico durante todo el proceso de abscisión. La AAA-ATPasa VPS4 cataliza el recambio continuo de subunidades dentro del polímero necesario para la escisión de membranas. En ausencia de esta proteína, los filamentos de 17 nm o bien no se forman o mantienen un diámetro constante, dando lugar a estructuras helicoidales de diámetro constante (Mierzwa et al., 2017).

La constricción secundaria avanza hasta encontrar a los haces de microtúbulos del puente como obstáculo principal. Para eliminarlos, la AAA-ATPasa Espastina es reclutada mediante su interacción con la subunidad CHMP1B del complejo ESCRT-III al sitio de máxima constricción (Fig- I-7), donde corta y deshace los haces de microtúbulos paralelos (Yang et al., 2008). En las fases finales de este proceso, la despolimerización de

los microtúbulos va acompañada de un proceso de remodelado del polímero de ESCRT-III. El filamento helicoidal se divide entonces en dos poblaciones bien diferenciadas (Fig. I-9C). Las primeras vueltas de la espiral, adyacentes al cuerpo de Flemming, pasan a formar una estructura anular muy similar a la observada en la fase de reclutamiento del complejo. Las subunidades situadas en el punto de máxima constricción se agrupan en una población aislada de la anterior y señalan el sitio de abscisión (Goliand et al., 2018). El mecanismo exacto que cataliza la fusión de membranas, al igual que ocurre en el resto de funciones del complejo, está por determinar (Fig. I-9D), aunque existen teorías que proponen la terminación del polímero en forma de cúpula como posible mecanismo (Elia et al., 2012).

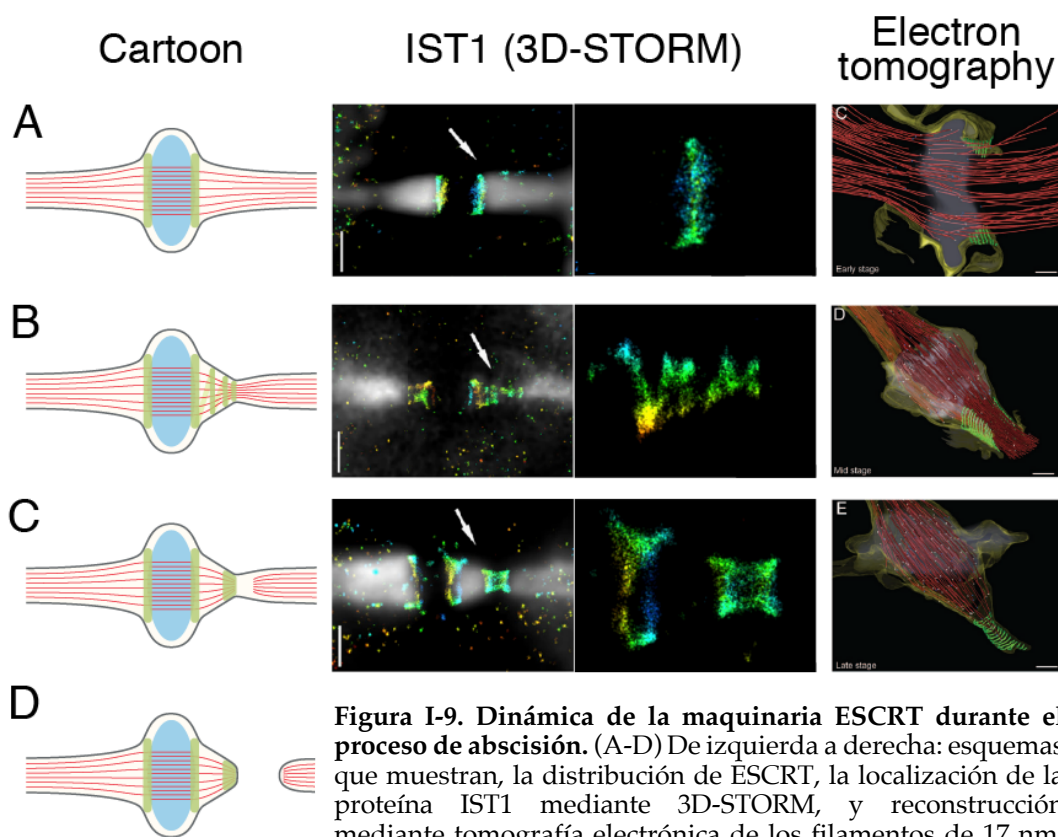


Figura I-9. Dinámica de la maquinaria ESCRT durante el proceso de abscisión. (A-D) De izquierda a derecha: esquemas que muestran, la distribución de ESCRT, la localización de la proteína IST1 mediante 3D-STORM, y reconstrucción mediante tomografía electrónica de los filamentos de 17 nm. Se muestra el estadio inicial de reclutamiento del complejo (A), la formación del polímero helicoidal (B) y su remodelado para dar lugar a dos poblaciones diferenciadas (C), además de la fase correspondiente a la escisión de membranas (D). Los paneles centrales se han extraído de Goliand et al. (2018), y los paneles derechos de Guizetti et al. (2011).

2.4.- Punto de control de abscisión

Debido al carácter irreversible del proceso de abscisión, existen mecanismos que aseguran que el reparto del material genético se produzca correctamente antes de la separación física de las células hijas. El denominado punto de control de abscisión retrasa la escisión de membranas como respuesta a varios estímulos, como la formación

incorrecta de los complejos del poro nuclear, la presencia de ADN en el cuerpo medio o la tensión mecánica en éste (Agromayor y Martin-Serrano, 2013; Petsalaki y Zachos, 2019). Dado que la resolución apresurada de la citocinesis en estas situaciones incrementaría el riesgo de daño genético, la activación del punto de control (Fig. I-10) dota a la célula de más tiempo para solucionar el problema antes de llevar a cabo la abscisión (Steigemann et al., 2009).

El *chromosomal passenger complex* (CPC), junto con las quinasas dependientes de ciclina y PLKs (*Polo-Like Kinases*) actúa como regulador de los diferentes puntos de control que coordinan la división celular (D'Avino y Capalbo, 2015; Petsalaki y Zachos, 2016). Formado por las proteínas Aurora B, INCENP, Survivina y Borealina, el CPC se localiza en el cuerpo medio al final de la mitosis, y media la activación del punto de control de abscisión. La interacción de Borealina con el extremo amino-terminal de CHMP4C acerca esta subunidad del complejo ESCRT-III a Aurora B, de la que es sustrato (Capalbo et al., 2012). La proteína CHMP4C presenta una región rica en serinas y treoninas (región INS) cerca del extremo carboxilo-terminal ausente en otras proteínas CHMP4 (Carlton et al., 2012). La fosforilación de CHMP4C mediada por Aurora B en la serina 210 (y en menor medida la 214 y 215) localizada en esta región es necesaria para la activación del punto de control de abscisión (Capalbo et al., 2012; Carlton et al., 2012). Una vez fosforilada, CHMP4C es capaz de interactuar con ANCHR, formando un complejo ternario con VPS4 que secuestraría esta última en el cuerpo de Flemming (Thoresen et al., 2014). La fosforilación de componentes del complejo ESCRT-III, CHMP4C entre ellas, por parte de la proteína ULK3 contribuye también a la inhibición del proceso de abscisión (Caballe et al., 2015). La proteína CHMP4C tiene por tanto un papel crucial en la activación del punto de control de abscisión, sirviendo de puente entre las quinasas mitóticas y la maquinaria ESCRT.

Aunque se han identificado varios de los actores que intervienen en el punto de control de abscisión, aún existen multitud de interrogantes sobre su mecanismo de acción y rutas de activación. Una posibilidad interesante es que la activación de la ruta disminuya el recambio de subunidades mediado por VPS4, lo que inhibiría el remodelado de los polímeros de ESCRT-III y la posterior escisión de membranas. El papel protector frente al daño genético del punto de control de abscisión ha sido recientemente confirmado en humanos. La mutación A232T en la proteína CHMP4C, característica de un alelo asociado a un mayor riesgo de cáncer de ovario, elimina la capacidad de esta proteína de unirse a ALIX, así como su capacidad de activar el punto de control de abscisión (Sadler et al., 2018).

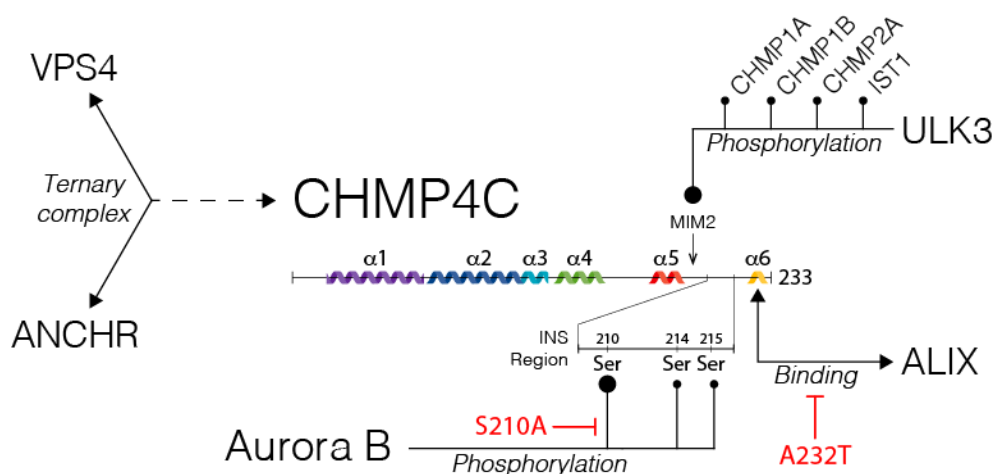


Figura I-10. Proteínas implicadas en la activación del punto de control de abscisión. La proteína CHMP4C ocupa una posición central en la ruta de activación de la vía. Se indican en cursiva la naturaleza de la relación entre las proteínas implicadas. Las líneas rojas señalan las mutaciones que perturban la ruta.

3.- El remanente del cuerpo medio

3.1.- Origen y posibles destinos

El cuerpo medio ha pasado de ser considerado una estructura vestigial a presentarse como la plataforma de reclutamiento y regulación de la maquinaria de abscisión (Mierzwa y Gerlich, 2014). Al auge en el interés hacia esta estructura durante el proceso de citocinesis le ha acompañado un esfuerzo creciente para determinar posibles papeles para el cuerpo medio tras el proceso de división (Chen et al., 2013; Dionne et al., 2015; Lujan et al., 2017). Pese a tratarse de un campo relativamente nuevo y no falto de controversia, en la última década varios grupos han tratado de caracterizar el destino y posibles funciones del denominado remanente del cuerpo medio.

Tras la división celular, el remanente del cuerpo medio puede ser liberado al entorno extracelular o heredado por una de las dos células hijas (Crowell et al., 2013). Mediante microscopía electrónica se ha determinado que en ambos casos el remanente del cuerpo medio retiene estructuras previas al proceso de abscisión, como son la matriz electrondensa del cuerpo de Flemming y sus microtúbulos antiparalelos, así como la membrana que rodea el conjunto (Mullins y Biesele, 1977). La liberación del remanente del cuerpo medio se produce como consecuencia de dos eventos de abscisión a sendos lados del cuerpo de Flemming. Las causas de la herencia de esta estructura por una de las células hijas, sin embargo, son prácticamente desconocidas. Si bien se ha propuesto la existencia de receptores de membrana que mediarían la retención del remanente del cuerpo medio (Crowell et al., 2014), su relación con la célula que lo hereda no ha sido caracterizada en detalle. Tanto el proceso de herencia como el destino del remanente del

cuerpo medio dependen del tipo celular y parecen ser procesos estrictamente regulados. Una vez heredada, esta estructura puede permanecer en la membrana plasmática durante largos periodos de tiempo antes de ser internalizada mediante un proceso dependiente de actina (Chai et al., 2012; Crowell et al., 2014; Peterman et al., 2019). Ya en el citoplasma, distintos tipos celulares exhiben distintas dinámicas, los remanentes pueden ser rápidamente degradados o retenidos más allá del siguiente ciclo celular (Ettinger et al., 2011; Fazeli et al., 2016).

La herencia del remanente del cuerpo medio rompe con la simetría del proceso de división. Sólo una de las dos células hijas, genéticamente idénticas, heredará un gran orgánulo compuesto por cientos de moléculas diferentes (Arai et al., 2015; Skop et al., 2004). Durante los últimos años, diversos estudios han tratado de relacionar la retención o liberación de remanente del cuerpo medio con procesos de proliferación, diferenciación y polarización celular, así como con el ensamblaje de estructuras celulares especializadas.

3.2.- Funciones post-mitóticas

La observación de un comportamiento diferencial entre células madre y tumorales en la retención de los remanentes del cuerpo medio despertó el interés a cerca de las funciones de esta estructura. Aunque algunos de los resultados recogidos en los primeros artículos han sido objeto de controversia, existen evidencias consistentes que relacionan la herencia del remanente del cuerpo medio y su posterior retención con mayor tumorigenicidad e invasividad en células tumorales (Kuo et al., 2011; Peterman et al., 2019). En células madre, por el contrario, la liberación del remanente del cuerpo medio acompaña a los procesos de diferenciación (Ettinger et al., 2011; Marzesco et al., 2005). Estas observaciones señalan la herencia y mantenimiento de esta estructura como un factor determinante para el destino celular.

I) Desarrollo

Durante la transición entre los estadios de 2 y 4 células en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*, el remanente generado en la primera división es endocitado específicamente por la célula EMS, precursora de las células musculares y del intestino (Chai et al., 2012). Esto se ha relacionado con el establecimiento del eje anteroposterior, aunque su relevancia para el proceso de desarrollo ha sido posteriormente objeto de debate (Ou et al., 2014). Procesos similares han sido observados durante el desarrollo del intestino y la faringe en este organismo (Chai et al., 2012). En su conjunto, estas observaciones confirman la existencia de mecanismos que regulan estrictamente la herencia del remanente del cuerpo medio.

El remanente del cuerpo medio, al tratarse de una estructura única, es utilizado por la célula para determinar el lugar de formación de estructuras especializadas. Durante el proceso de neurogénesis, un evento de ruptura de simetría es necesario para determinar el sitio de aparición de la primera neurita. En las neuronas sensoriales de *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que el establecimiento de la polaridad neuronal depende de la localización del remanente del cuerpo medio. Esta estructura determina el lugar de reclutamiento de la maquinaria necesaria, así como del centrosoma, que aseguran la formación de la neurita (Pollarolo et al., 2011).

II) Polaridad celular

En cultivos tridimensionales de células epiteliales, la polaridad celular se determina al final de la primera división celular. El AMIS (*Apical Membrane Initiation Site*) se organiza en torno a los extremos del cuerpo medio, señalizando el lugar de aparición de la futura membrana apical (Li et al., 2014). Durante las subsiguientes divisiones, la constricción desigual del surco de división hace que la abscisión del cuerpo medio se produzca en el recién formado lumen. Los remanentes del cuerpo medio generados en estas divisiones se mantienen por tanto asociados a la membrana apical (Lujan et al., 2016). La adición de remanentes purificados a la membrana basolateral de estas células produce una reorganización parcial en su composición, observándose una pérdida de marcadores propios de esta membrana y un reclutamiento de marcadores apicales (Lujan et al., 2017). Estos datos sugieren que el cuerpo medio puede actuar como determinante de la polaridad celular no sólo durante, sino también después del proceso de división.

III) Formación del cilio primario en células epiteliales polarizadas

El cilio primario es una protrusión de la membrana plasmática que se encuentra en la superficie de la mayoría de las células de mamífero. Llamado a veces “la antena celular”, se trata de un compartimento especializado de señalización implicado tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la homeostasis tisular (Gerdes et al., 2009; Singla y Reiter, 2006). La membrana ciliar, continua con la membrana plasmática pero con una composición diferente a ésta, está sustentada por el axonema, un andamiaje de microtúbulos que se genera a partir del cuerpo basal, que deriva del centriolo más antiguo del centrosoma.

El proceso de formación del cilio primario, o ciliogénesis, depende del tipo celular (Bernabe-Rubio y Alonso, 2017; Ishikawa y Marshall, 2011). Las células mesenquimales, como los fibroblastos, ensamblan el cilio mediante la denominada ruta intracelular. Ésta comienza con la asociación de una vesícula, la vesícula ciliar, con uno

de los extremos del cuerpo basal. La elongación posterior de los microtúbulos empuja la vesícula formando una doble membrana que encapsula el axonema incipiente. La fusión de la membrana externa con la membrana plasmática expone el cilio al ambiente extracelular una vez está completamente ensamblado. Las células epiteliales, por el contrario, siguen la denominada ruta alternativa, en la que el cuerpo basal se une a la membrana plasmática sin mediación de ninguna vesícula. En este caso el proceso de ciliogénesis tiene lugar íntegramente en la superficie de la membrana.

Estudios previos en el laboratorio han descrito el papel crucial del remanente del cuerpo medio en la ruta alternativa de ciliogénesis, pobremente caracterizada hasta entonces. Utilizando como modelo la línea celular epitelial de riñón MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), determinaron que el remanente del cuerpo medio, una vez heredado por una de las células hijas, viaja por la superficie apical hasta encontrarse con el cuerpo basal (Bernabe-Rubio et al., 2016). La reunión de estas dos estructuras, junto con el confinamiento celular, sirven de detonante para el inicio del proceso de ciliogénesis (Fig. I-11). La extracción física del remanente del cuerpo medio disminuye drásticamente la capacidad de la célula de ensamblar un cilio primario, lo que confirma el papel crucial de esta estructura en el proceso.

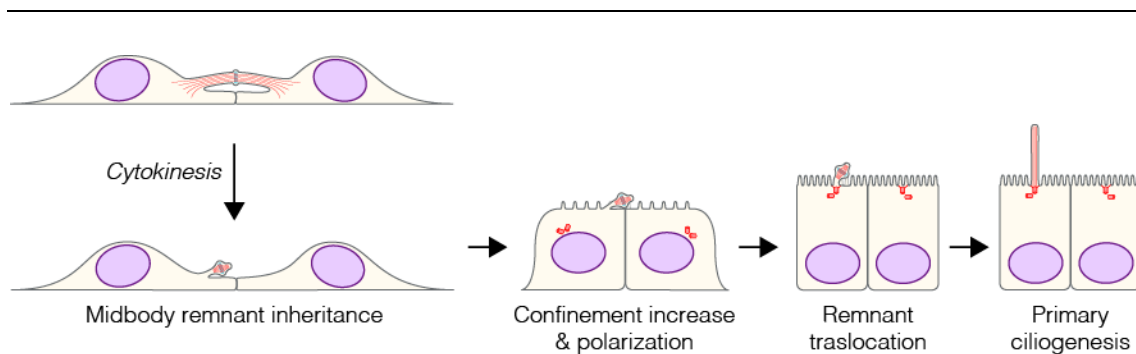


Figura I-11. Ruta alternativa de ciliogénesis. Tras la citocinesis, una de las células hereda el remanente del cuerpo medio. El aumento del confinamiento físico desencadena la polarización de la célula, que promueve el movimiento del remanente y su posterior reunión con el centrosoma en el centro de la membrana apical, lo que desencadena el ensamblaje del cilio primario.

La herencia del remanente del cuerpo medio tras la división celular, seguida de su retención a largo plazo durante los sucesivos ciclos, son necesarias por tanto para asegurar una población suficientemente grande de células capaces de formar un cilio primario. La caracterización de los mecanismos que median la herencia y retención de esta estructura permitirían arrojar luz sobre los mecanismos que median las funciones post-mitóticas del remanente del cuerpo medio.

OBJETIVOS

El remanente del cuerpo medio ha pasado de ser considerado una estructura prácticamente vestigial a presentarse como un centro de señalización determinante para el destino celular. Aunque se ha descrito la implicación de esta estructura en múltiples procesos, los mecanismos que median su retención tras la división celular han sido objeto de poca atención hasta la fecha. Para abordar esta cuestión, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Analizar la relación entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática de la célula que lo hereda.
- 2.- Examinar la distribución de la maquinaria de abscisión más allá del fin del proceso de citocinesis.
- 3.- Investigar el mecanismo molecular que controla la herencia del remanente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Materiales

1.1.- Anticuerpos

1.1.1.- Anticuerpos primarios

Los anticuerpos utilizados para inmunodetección (WB) e inmunofluorescencia (IF) se describen en la Tabla 1:

Tabla 1: Anticuerpos primarios

Proteína	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
α -tubulina total	ratón	Merck (T6199)	1:5000	-
α -tubulina tirosinada	rata	Merck (MAB1864)	-	1:200
α -tubulina acetilada	ratón	Merck (T7451)	-	1:500
ALIX	ratón	(Bajorek et al., 2009)	-	1:500
CHMP1A	conejo	Abcam (ab178686)	-	1:500
CHMP1B	conejo	Merck (HPA061997)	-	1:500
CHMP2A	conejo	Proteintech (10477-1-AP)	-	1:500
CHMP4C	conejo	Martín-Serrano Lab	1:200	-
GFP	ratón	Roche (11814460001)	1:1000	-
IST1	ratón	(Bajorek et al., 2009)	-	1:1000
MKLP1	conejo	Santa Cruz (sc-867)	-	1:100
PRC1	ratón	ThermoFisher (MA1-846)	-	1:100

1.1.2.- Anticuerpos secundarios

En la siguiente tabla se recogen los anticuerpos utilizados para el proceso de revelado de la inmunodetección, así como para inmunofluorescencia:

Tabla 2: Anticuerpos secundarios

Proteína	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
Anti-IgGs conejo, HRP	burro	GE Healthcare (NA934V)	1:5000	-
Anti-IgGs ratón, HRP	burro	Jackson ImmunoResearch (715-035-151)	1:5000	-
Anti-IgGs conejo, Alexa 488	burro	ThermoFisher (A-21206)	-	1:500
Anti-IgGs conejo, Alexa 555	burro	ThermoFisher (A-31572)	-	1:500
Anti-IgGs conejo, Alexa 647	burro	ThermoFisher (A-31573)	-	1:500
Anti-IgGs ratón, Alexa 488	burro	ThermoFisher (A-21202)	-	1:500
Anti-IgGs ratón, Alexa 555	burro	ThermoFisher (A-31570)	-	1:500

Anti-IgGs ratón, Alexa 647	burro	ThermoFisher (A-31571)	-	1:500
Anti-IgGs rata, Alexa 488	burro	ThermoFisher (A-21208)	-	1:500
Anti-IgGs rata, Alexa 555	cabra	ThermoFisher (A-21434)	-	1:500

1.2.- Reactivos

Los reactivos y soportes para cultivo celular utilizados en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3: Reactivos y soportes de cultivo

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Polietilenimina (PEI)	Polysciences	23966-1
Lipofectamina 2000	ThermoFisher	11668030
BglII	New England	R0144S
HindIII	Roche	10656313001
EcoO19I	New England	R0503S
AflIII	New England	R0541S
ProLong Glass	ThermoFisher	P-36982
Soportes permeables Transwell	Corning	3413
Placas de 24 pocillos (M24) con fondo de vidrio	MatTek	P24-1.5H-N
Placas de 35mm con fondo de vidrio	MatTek	P35G-1.5-20-C
Oro coloidal de 250 nm	BBi Solutions	em.gc250
Paraformaldehído	Merck	30525-89-4
Glutaraldehído	EMS	16220
Hexametildisilazano (HMDS)	Merck	440191
Inhibidores de proteasas	Merck	11697498001
Partículas magnéticas anti-GFP (<i>GFP-Trap</i>)	ChromoTek	gtma-10
Solución de Laemmli	Merck	S3401
Tween-20	Merck	P7949
DAPI	Merck	268298
To-Pro-3	ThermoFisher	T-3605
G418	Santa Cruz	Sc-29065B

1.3.- Plásmidos

Los plásmidos utilizados durante la realización de este trabajo se describen en la siguiente tabla:

Tabla 4: Plásmidos

Plásmido	Procedencia	Referencia
EGFP-tubulina	Takara Bio	-
mCherry-tubulina	Takara Bio	-
pNG72-GFP-L-CHMP4B	Juan Martín Serrano, King's College London	Ventimiglia et al., 2018

pNG72-GFP-L-CHMP4C	Juan Martín Serrano, King's College London	-
pNG72-GFP-L-CHMP4CS210A	Generado mediante mutagénesis dirigida	-
pNG72-GFP-L-CHMP4BA232T	Juan Martín Serrano, King's College London	Sadler et al., 2018
MLV-GagPol/pHIV 8.1	Juan Martín Serrano, King's College London	-
pHIT VSVg	Juan Martín Serrano, King's College London	-
pCMS28/mScarlet	Juan Martín Serrano, King's College London	
pSuper	OligoEngine	-
pEGFP-N1	Clontech	-
pSuperEGFPN1-sh4C	Generado en el laboratorio	-

Para la generación del plásmido pSuperEGFPN1-sh4C se clonó en primer lugar un fragmento codificante de un shRNA contra el gen CHMP4C entre los sitios BglII y HindIII del plásmido pSuper siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se combinó con un plásmido pEGFP-N1 mediante el uso de los sitios de restricción EcoO019I y AflIII. De este modo se obtuvo el plásmido pSuperEGFPN1-sh4C, que codifica un shRNA específico contra el gen CHMP4C así como un gen reportero GFP, ambos bajo el control de promotores independientes (Fig. M-1).

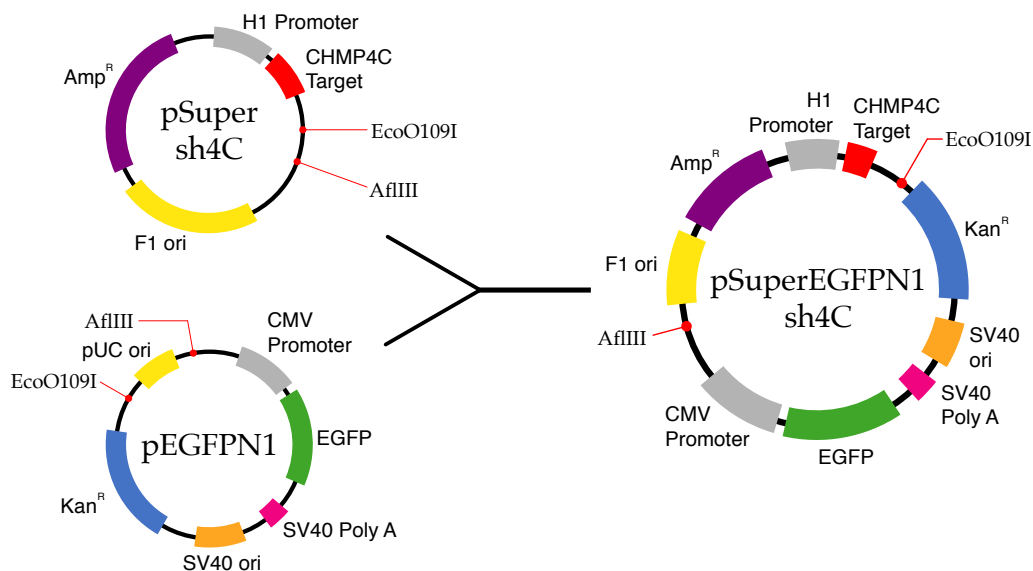


Figura M-1. Proceso de obtención del plásmido pSuperEGFPN1-sh4C. Detalle de los plásmidos originales y el plásmido resultante. Para la obtención del vector se utilizaron los sitios de restricción únicos AflIII y EcoO109I.

1.4.- Oligonucleótidos

En las siguientes tablas se describen los oligonucleótidos utilizados para la generación de plásmidos mediante mutagénesis dirigida (Tabla 5) así como para el silenciamiento génico mediante ARN de interferencia (siRNA) (Tabla 6) y microRNA en horquilla (shRNA) (Tabla 7). Los oligonucleótidos de ADN fueron sintetizados por Merck, y los de siRNA por Invitrogen.

Tabla 5: Oligonucleótidos para mutagénesis

Plásmido	Plásmido molde	Nombre	Secuencia (5'-3')
pNG72-GFP-L-CHMP4CS210A	pNG72-GFP-L-CHMP4C	S210A_F	CTGCTCGGGCTCGACGTGCAGTGGAC
		S210A_R	GTCCACTGCACGTGAGCCCCGAGCAG

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida se utilizó el kit comercial “*QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit*” (Agilent Technologies).

Tabla 6: Oligonucleótidos para silenciamiento mediante siRNA

Proteína	siRNA	Secuencia (5'-3')
CHMP4C	si4C_F	CTCGCTCAGATTGATGGCACA
	si4C_R	TGTGCCATCAATCTGAGCGAG
Control	siControl3	UAGCGACUAAACACAUCAA

El siRNA contra CHMP4C está diseñado contra la misma región que el descrito en Carlton et al. (2012). Se realizaron los cambios necesarios en la secuencia para asegurar su efectividad contra el gen de perro.

Tabla 7: Oligonucleótidos para el silenciamiento mediante shRNA

Proteína	shRNA	Secuencia (5'-3')
CHMP4C	sh4C_F	GATCCCCCTCGCTCAGATTGATGGCACATTCA AGAGATGTGCCATCAATCTGAGCGAGTTTTTG
	sh4C_R	ACGTCAAAAActcgctcagattgatggcacaT CTCTTGAAAtgtgccatcaatctgagcgagGGG

2.- Métodos

2.1.- Bacterias

Para la obtención de plásmidos de expresión en eucariotas se utilizaron células termocompetentes *Escherichia coli* XL10-Gold. Para la transformación mediante choque térmico se añadieron 50 µL de células a una dilución de plásmido en agua, seguido de 30 min de incubación en hielo. El choque térmico (1 min a 42 °C y 2 min a 4 °C) fue

seguido de 1 h de incubación a 37 °C con 250 µL de medio súper óptimo con represión de catabolitos (SOC). Por último, 150 µL de la mezcla fue sembrada en placas de LB-Agar incluyendo en antibiótico correspondiente y se incubaron durante 16-20 h a 37 °C.

2.2.- Cultivos celulares

Las células epiteliales de perro MDCK II (CRL2936) se cultivaron en MEM (*Minimum Essential Media*) suplementado con suero bovino fetal (FBS) (Merck) al 5%, glutamina al 1% y en presencia de antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin a 100 µg/mL). Para mantener el cultivo en crecimiento se llevaron a cabo diluciones cada 3 días. Tras un lavado inicial de 20 min con PBS se trataron las células con una solución de tripsina al 0,05% y EDTA al 0,02% durante 5 min. La línea celular HEK 293T fue cultivada en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con FBS al 10% y antibióticos.

Durante el transcurso de todos los experimentos las células se mantuvieron en una incubadora a 37 °C en presencia de CO₂ al 5% y humedad relativa del 95%. Todos los trabajos con células eucariotas se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Se realizaron test de detección de *Mycoplasma* periódicamente (HEK-Blue detection, Invivogen).

2.3.- Transfección de ADN y de ARN de interferencia

I) *Electroporación*: Para la expresión exógena de formas de tubulina fluorescente, 5 µg de plásmido fueron transfectados mediante electroporación con nucleofector (Amaxa Nucleofector Technology, Lonza) utilizando el programa L-005 según las instrucciones del fabricante.

II) *Transducción mediante vectores retrovirales*: Para el empaquetamiento de los vectores virales pNG72 o pCMS28 se utilizó PEI para cotransfectar células HEK 293T con la construcción deseada, así como los vectores de empaquetamiento GagPol/pHIV 8.1 y pHIT VSVg en una ratio 2:3:1. 48 h tras la transfección el sobrenadante de estas células se centrifugó y se pasó por un filtro de 0,2 µm antes de ser utilizado para transducir las células MDCK.

III) *Lipofección*: En los experimentos de silenciamiento génico mediante siRNA, 3x10⁴ células fueron lipofectadas utilizando Lipofectamina 2000 con siRNA control o contra el gen CHMP4C (ambos a una concentración final de 100 nM). El silenciamiento se llevó a cabo mediante un tratamiento doble realizado 48 y 6 h antes del inicio del experimento.

Para los silenciamientos mediante shRNA se llevó a cabo una única ronda de lipofección según las instrucciones del fabricante.

2.4.- Generación de células con expresión estable

Para la generación de células con expresión estable de EGFP y mCherry-tubulina se transfectaron 1×10^6 células mediante electroporación con los plásmidos antes mencionados. A la hora de sembrar las células se realizaron diluciones seriadas para asegurar la correcta separación de los futuros clones. 48 h tras la transfección se añadió G418 al medio de cultivo (2 mg/mL), tras el proceso de selección los clones resultantes fueron analizados mediante microscopía de fluorescencia.

En el caso de los vectores pNG72 y pCMS28, 5×10^3 células fueron incubadas con el sobrenadante lentiviral correspondiente durante 3 días. Las células resultantes se diluyeron cada 3 días durante 2 semanas antes de ser sometidas a separación celular mediante citometría de flujo. Mediante la utilización de un citómetro FACS Aria Fusion se seleccionó una población de células positivas con un nivel de expresión intermedio.

2.5.- Inmunoprecipitación

Células MDCK II que expresan de manera estable los diferentes mutantes de CHMP4C fueron lisadas a 4 °C en 1 mL de solución de lisis (50 mM Tris; pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 5% glicerol; 1% Triton X-100 e inhibidores de proteasas). Los extractos fueron sonicados y centrifugados durante 10 min, el sobrenadante clarificado fue incubado a continuación con micropartículas magnéticas unidas a anti-GFP (*GFP-Trap*) durante 2 h seguidas de cuatro rondas de lavados. Las proteínas unidas se eluyeron mediante la adición de tampón de Laemmli y tratamiento térmico a 95 °C durante 5 min.

2.6.- Electroforesis de proteínas e inmunodetección

Los extractos proteicos preparados con solución de Laemmli se sometieron a separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del agente desnaturizante SDS (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. A modo de referencia se separaron al mismo tiempo que las muestras de interés los marcadores de peso molecular Dual-Color (Bio-Rad). Para el proceso de separación se utilizó el sistema Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) a un amperaje constante de 30 mA por gel durante 1 h.

Como paso previo a la inmunodetección, las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de Immobilon-PVDF (Bio-Rad). El proceso de transferencia se llevó a cabo a un voltaje constante de 90 V durante 90 min, una vez finalizado la membrana se bloqueó con una solución de leche en polvo al 5% en PBS con

Tween-20 al 0,05%. La membrana fue incubada durante la noche a 4° C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo, seguida de tres lavados de 10 min con PBS Tween-20 al 0,05%. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario diluido en solución de lavado durante 1 h y se lavó de nuevo 3 veces. La detección de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia gracias a la proteína HRP unida al anticuerpo secundario, así como el uso del reactivo ECL (*Enhanced Chemi-Luminescence*, Bio-Rad) y la cámara Amersham 600 (General Electric).

2.7.- Inmunofluorescencia indirecta

Para la preparación de muestras para inmunofluorescencia las células fueron sembradas en cubreobjetos circulares mantenidos en placas de 24 pocillos (Corning). Una vez terminado el experimento correspondiente las células fueron fijadas en metanol frío durante 5 min a -20 °C, seguido de un bloqueo con PBS-BSA al 3% durante 30 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C, se sometieron a tres rondas de lavado con PBS de 10 min y a continuación e incubaron con los anticuerpos secundarios durante 45 min. Tras los lavados finales, las muestras fueron montadas sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Prolong Glass.

2.8.- Microscopía confocal

I) *Microscopía de súper-resolución*: Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio N-SIM-S (Nikon) equipado con un objetivo 100x de inmersión en silicona (apertura numérica, NA, 1.49). Una serie de imágenes abarcando todo el grosor de la célula fue adquirida en modo 3D-SIM y procesada con el software NIS-Elements (Nikon). En las imágenes correspondientes se muestra la proyección máxima de toda la célula o de aquellos planos que contienen la estructura de interés (en las ampliaciones).

II) *Microscopía confocal*: Para el análisis de la localización de la maquinaria ESCRT se utilizó el microscopio confocal LSM 800 (Zeiss) equipado con un objetivo 63x de inmersión en aceite (NA 1.4) y el microscopio *spinning disk Eclipse Ti-E inverted CSU-X1* (Nikon) equipado con un objetivo 100x de inmersión en aceite (NA 1.4). En todos los casos se muestra la proyección suma de aquellos planos que contienen la estructura de interés.

Independientemente de su origen, todas las imágenes obtenidas han sido procesadas utilizando Fiji (ImageJ). La maquetación de las figuras se llevó a cabo con los programas Photoshop e Illustrator CS6 (Adobe).

2.9.- Videomicroscopía

En todos los casos las células fueron sembradas en soportes con fondo de vidrio y mantenidas en MEM sin rojo fenol a 37 °C y 5% de CO₂ durante todo el experimento.

I) *Análisis del movimiento tridimensional del remanente del cuerpo medio*: Para este experimento se utilizó un microscopio confocal A1R+ (Nikon) equipado con un objetivo 60x de inmersión en agua (NA 1.2). Mediante la utilización de un escáner resonante, se adquirió una serie de imágenes abarcando todo el grosor del remanente del cuerpo medio cada segundo. Para mejorar la relación señal/ ruido, las imágenes resultantes se sometieron a un proceso de deconvolución mediante el software Huygens 18 (SVI). La reconstrucción 3D se generó con el programa NIS-Elements (Nikon), el volumen de confinamiento se obtuvo mediante la proyección temporal máxima correspondiente a todo el experimento.

II) *Cuantificación del área de confinamiento*: En análisis cuantitativo bidimensional se llevó a cabo partiendo de imágenes obtenidas en un microscopio *spinning disk Eclipse Ti-E inverted CSU-X1* (Nikon) equipado con un objetivo 100x de inmersión en aceite (NA 1.4). La posición del punto de máxima intensidad fue registrada cada segundo durante 3 min. Para reducir cada experimento de videomicroscopía a una única cifra se determinó el centro geométrico de cada trayectoria obtenida, y a partir de éste, un círculo que contiene el 95% de los puntos. El radio de este círculo es utilizado posteriormente para el análisis estadístico.

III) *Cuantificación del tiempo de abscisión*: 3×10^5 células se sembraron en un pocillo de una M24 con fondo de vidrio y fueron sometidas al protocolo de silenciamiento mediante siRNA antes mencionado. Se adquirió una imagen cada 10 min con un microscopio de fluorescencia *Ti-Eclipse wide-field inverted microscope* (Nikon) controlado por el programa NIS-Elements (Nikon). Se ha considerado tiempo de abscisión como el transcurrido entre el establecimiento del cuerpo medio y la retracción de la estructura tras el primer evento de abscisión.

2.10.- Microscopía correlativa

Como paso previo al sembrado de las células, nanoesferas de oro de 250 nm de diámetro se depositaron sobre placas de 35 mm con fondo de vidrio recubiertas previamente con polilisina (a razón de 1×10^4 nanoesferas/mm²). Se realizaron marcas de referencia en el cubreobjetos para localizar el área a estudiar y mantener la orientación de la muestra durante la adquisición de imágenes mediante los dos métodos utilizados. Tras la esterilización de la placa mediante tratamiento con luz UV, $1,5 \times 10^4$ células MDCK

II con expresión de las proteínas fluorescentes correspondientes fueron sembradas sobre la placa. Una vez transcurridas 48 h, las células fueron prefijadas con un volumen de fijador 2x (4% paraformaldehído y 4% glutaraldehído en tampón fosfato) igual al del medio de cultivo durante 10 min, seguido de 3 h de incubación con fijador 1x.

Para el componente de microscopía confocal se utilizó un microscopio A1R+ (Nikon) equipado con un objetivo 60x de inmersión en agua (NA 1.2). En primer lugar, se adquirió una imagen de baja magnificación para ser utilizada durante el alineamiento y como referencia de navegación en la muestra; esta imagen incluye los canales de fluorescencia, así como un canal de reflexión que permite detectar las nanoesferas de oro sobre el sustrato. A continuación, se seleccionaron las estructuras candidatas a ser remanentes del cuerpo medio atendiendo a la ausencia de continuidad con el cuerpo celular del marcaje de tubulina, adquiriéndose imágenes de alta resolución en los casos necesarios.

Para preparar la muestra para su análisis por SEM se separó el cubreobjetos de la placa y las células fueron deshidratadas mediante inmersión en soluciones con concentraciones crecientes de etanol en tampón fosfato (3 min de incubación por solución en incrementos del 10%). Tras la deshidratación, el etanol fue sustituido por hexametildisilazano (HMDS), mediante incubación durante 3 min en una solución 1:1 de etanol-HMDS y HMDS puro. El exceso de líquido fue retirado y la muestra se dejó secar en la cabina de gases durante la noche. Una vez deshidratada y desecada la muestra, el cubreobjetos con la muestra se sujetó a un portamuestras de acero inoxidable con cinta adhesiva de carbono y se rodeó con cinta de cobre para reducir la acumulación de carga.

Las imágenes de SEM fueron adquiridas con un microscopio Verios 460 (FEI). Este equipo, perteneciente a la última generación de microscopios electrónicos de barrido, permite alcanzar resolución subnanométrica en muestras biológicas sin necesidad de recubrimientos metálicos y sobre sustratos aislantes. La utilización de tecnologías como el *beam-deceleration* permite mantener la calidad del haz de electrones a la vez que reduce la acumulación de carga y asegura la integridad del espécimen.

En primer lugar, la orientación de la muestra fue ajustada sirviéndonos de las marcas de referencia realizadas previamente y de la cámara presente en el interior del microscopio. Para lograr el alineamiento inicial, se tomó una imagen de baja magnificación similar a la obtenida previamente por microscopía confocal. Comparando ambas imágenes e identificando el patrón formado por las células se localizaron las

estructuras de interés en la imagen de SEM. Las imágenes fueron adquiridas a 1 kV con una corriente de 13 pA mediante un detector de electrones secundarios. La posición de las nanoesferas de oro presentes sobre el sustrato en ambos grupos de imágenes fue utilizada para el alineamiento final mediante el uso del software TrackEM2 (ImageJ).

Para observar las estructuras de interés desde distintos ángulos, se inclinó la pletina con la muestra 45° con respecto al haz de electrones y se obtuvo una serie de imágenes mediante rotación de la misma en incrementos de 30° (Fig. M-2). Se generaron reconstrucciones tridimensionales de las imágenes de confocal correspondientes con el software NIS-Elements (Nikon), siendo después rotadas y giradas hasta hacer coincidir su orientación con la de sus contrapartidas de SEM.

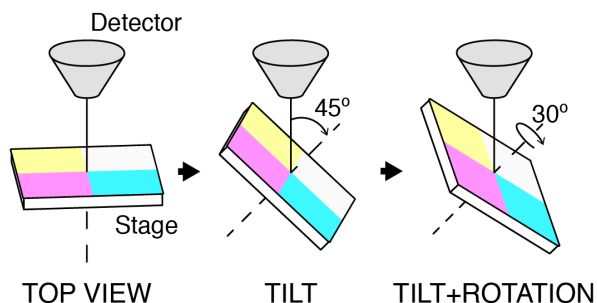


Figura M-2. Proceso de obtención de una serie de imágenes de rotación mediante SEM. Ilustración de la posición de la muestra con respecto al haz de electrones durante la adquisición de una imagen en vista apical (izquierda) y una serie de rotación (centro y derecha)

2.11.- Caracterización morfológica del remanente del cuerpo medio

Se obtuvo una imagen en vista apical para cada estructura identificada como remanente del cuerpo medio mediante CLEM. Las estructuras que mostraban continuidad entre el extremo de uno de los conos que flanquean el cuerpo de Flemming y la membrana plasmática fueron clasificadas como conectadas. Para el estudio de simetría se consideró el tamaño general de las regiones que flanquean el cuerpo de Flemming.

Para cuantificar el tamaño de los remanentes del cuerpo medio en imágenes apicales se identificaron los puntos indicados en la figura M-3 en cada uno de los casos. Si bien la medida de la anchura del cuerpo de Flemming (C-D) no se ve afectada por la inclinación de la estructura, la longitud real de la misma no puede determinarse directamente a partir de una vista apical. Para corregir el valor de longitud teniendo en cuenta la inclinación de cada estructura se siguió el procedimiento detallado en la figura M-3.

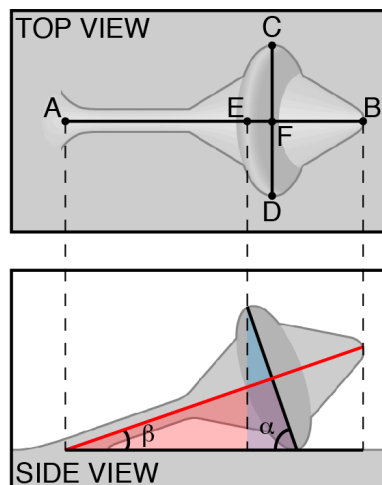


Figura M-3. Puntos de referencia utilizados durante la caracterización morfológica de los remanentes del cuerpo medio mediante SEM. El punto de conexión (A), el extremo opuesto del remanente (B), el eje mayor del cuerpo de Flemming (C-D) y el borde (E), así como el centro de éste (F) fueron determinados para cada estructura analizada. Las distancias entre estos puntos fueron utilizadas para determinar la longitud real de la estructura según la siguiente fórmula:

$$\alpha = \sin^{-1} \frac{2 \times (E - F)}{C - D} \quad \beta = 90 - \alpha \quad L = \frac{A - B}{\cos \beta}$$

2.12.- FRAP

Las células fueron sembradas en soportes con fondo de vidrio (MatTek) y mantenidas en MEM sin rojo fenol a 37 °C y con 5% de CO₂ durante todo el experimento. Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio confocal A1R+ (Nikon) equipado con un objetivo 60x de inmersión en agua (NA 1.2). En todos los casos se utilizó el marcaje de tubulina-GFP para identificar la estructura de interés y seleccionar el área a fotoblanquear.

En todas las fases del experimento se adquirieron series de imágenes abarcando toda la estructura a analizar cada 10 segundos. Tras la adquisición de tres imágenes del estado basal se llevaron a cabo 3 ciclos de fotoblanqueo con una potencia de láser 20 veces superior a la utilizada para la fase de adquisición. Durante los 10 min siguientes se adquirieron imágenes para evaluar la recuperación de la fluorescencia.

Para el análisis de los datos se cuantificó, además de la región que contiene la estructura de interés, la señal de fondo y la de una región no afectada por el fotoblanqueo para compensar la pérdida de señal durante la fase de adquisición. Los datos de fluorescencia se relativizaron en cada caso a la señal media correspondiente a las imágenes del estado basal.

2.13.- Ensayo de ciliogénesis

Las células MDCK fueron transfectadas con el plásmido (pSuperEGFPN1-sh4C) o el vector vacío (pSuperEGFPN1) mediante electroporación, 9x10⁵ células fueron sembradas en soportes permeables Transwell (Corning). 72 h después las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia y se adquirieron imágenes con un microscopio LSM 510 (Zeiss) equipado con un objetivo 63x de inmersión en aceite (NA

1.4). El porcentaje de células ciliadas fue determinado para las células positivas y negativas para GFP, la ratio entre estos valores es utilizado para neutralizar posibles diferencias en el nivel de polarización celular entre condiciones.

2.14.- Análisis estadístico

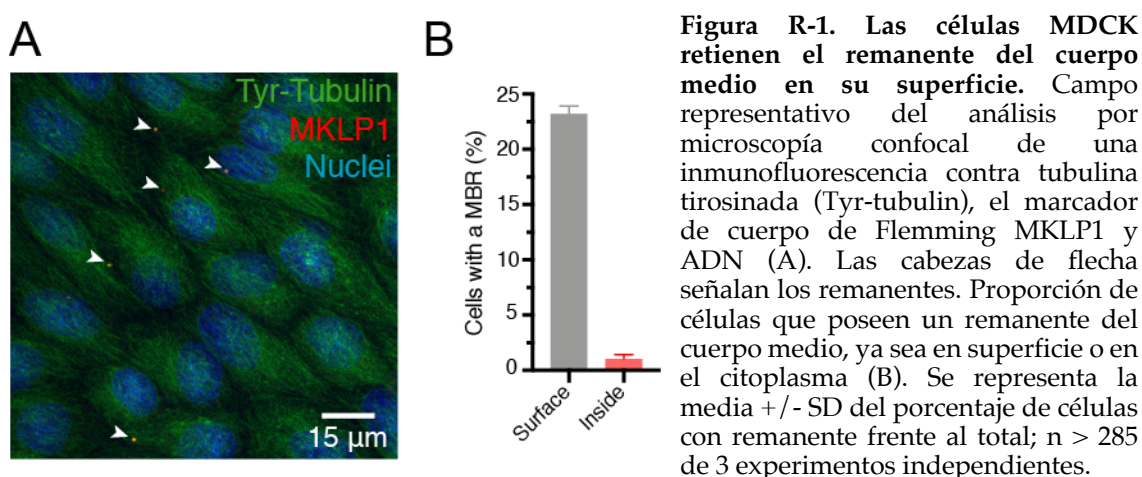
El software Prism 8 (Graphpad) se ha utilizado para la elaboración de las gráficas y la realización de los análisis estadísticos. La significancia estadística de la diferencia entre las medias analizadas se ha establecido mediante la prueba t de Student no pareada. La información adicional correspondiente a cada experimento se indica en las leyendas de las figuras.

RESULTADOS

1.- La mayoría de los remanentes del cuerpo medio se encuentran en la superficie celular

Para investigar la relación existente entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática escogimos la línea celular MDCK, generada a partir de células epiteliales del túbulo distal de riñón de perro y paradigma de célula epitelial polarizada (Rodríguez-Boulan et al., 2005). Estas células siguen la ruta alternativa de ciliogenesis, que requiere la herencia del remanente del cuerpo medio y su posterior reunión con el centrosoma para ensamblar el cilio primario (Bernabe-Rubio et al., 2016).

El remanente del cuerpo medio retiene algunas de las estructuras generadas durante el proceso de citocinesis, como son el cuerpo de Flemming y parte de los microtúbulos (Mullins y Bieseke, 1977). La elevada concentración de proteínas de la zona central del huso en esta estructura permite su identificación mediante inmunofluorescencia. En un cultivo subconfluente de MDCK, aproximadamente el 25% de las células posee un remanente del cuerpo medio, identificable como una estructura positiva para el marcador MKLP1 y rica en tubulina (Fig. R-1A). Estas estructuras se encuentran en la superficie de la membrana plasmática en la inmensa mayoría de los casos, a razón de una por célula y cerca de las uniones intercelulares (Fig. R-1B).



La observación más detallada mediante microscopía confocal de super-resolución permitió distinguir las diferentes partes del remanente: el cuerpo de Flemming aparece como una estructura en forma de disco flanqueada por dos acúmulos de microtúbulos con forma cónica (Fig. R-2A). A diferencia de las fases previas del proceso de abscisión (Fig. R-2B), ninguno de estos dos acúmulos es continuo con el resto del cuerpo celular. Esta ausencia de continuidad, junto con la presencia de marcadores

específicos, es el criterio utilizado para distinguir los remanentes del cuerpo medio de otros intermediarios del proceso de abscisión en este trabajo.

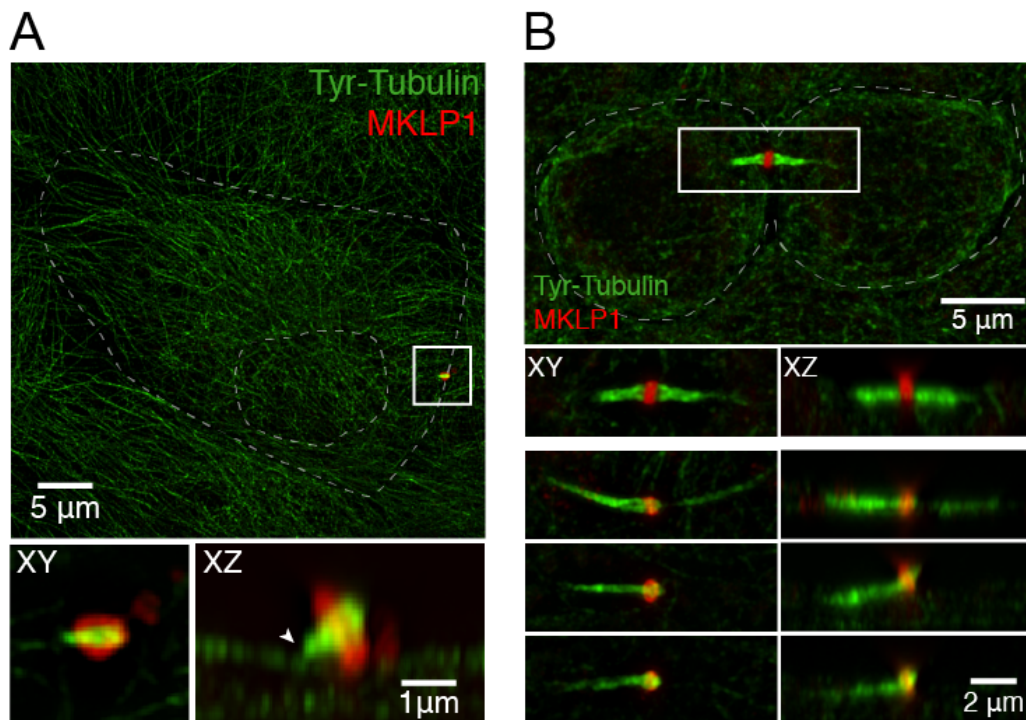


Figura R-2. El remanente del cuerpo medio no presenta marcaje de tubulina continuo con el cuerpo celular. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de súper-resolución de un remanente del cuerpo medio (A) y fases previas del proceso de abscisión (B). La cabeza de flecha señala la ausencia de continuidad en el marcaje de tubulina entre el remanente y la superficie apical

Atendiendo únicamente al marcaje de tubulina, los remanentes parecen encontrarse “posados” sobre la superficie de la membrana apical sin que se pueda observar ninguna conexión con ésta mediante microscopía confocal.

2.- El remanente del cuerpo medio permanece conectado con la membrana plasmática mediante una conexión membranosa

La separación física de las células hijas al final de la citocinesis se produce mediante la escisión tanto de los microtúbulos como de la membrana plasmática durante el proceso de abscisión. La desaparición del marcaje de tubulina a uno de los lados del cuerpo de Flemming, unida a la retracción del resto de la estructura como consecuencia de la liberación de tensión mecánica, son consideradas indicadores fiables de la escisión total de uno de los brazos del cuerpo medio. Aunque un único evento de abscisión es suficiente para poner fin a la citocinesis, puede ir acompañado de otro evento en el lado opuesto del cuerpo de Flemming; ambos pueden darse de forma simultánea o

secuencial, siendo este último el mecanismo utilizado por las células MDCK. En el caso del segundo evento de abscisión, que determinará el destino del remanente, la retención de esta estructura tras la eliminación de los microtúbulos no va acompañada de ningún fenómeno que permita monitorizar la integridad de la membrana. La cercanía del remanente del cuerpo medio a la superficie apical de la célula impide distinguir la membrana plasmática de la del remanente mediante microscopía confocal. Con el objetivo de determinar la integridad de la membrana plasmática en el lugar del segundo evento de abscisión hemos combinado la especificidad de la microscopía confocal con el poder de resolución de la microscopía electrónica de barrido (SEM).

En un microscopio electrónico de barrido, un haz de electrones es acelerado mediante una diferencia de potencial dentro de una columna de alto vacío y utilizado para escanear la superficie de un material. La interacción del haz de electrones con los átomos de la muestra desencadena la liberación de más electrones (secundarios), que son atraídos y registrados por el detector. El ángulo de incidencia del haz en cada punto determinará el número de electrones secundarios liberados, dando lugar a imágenes en blanco y negro en las que las superficies inclinadas y los bordes son más brillantes que las zonas planas.

Además de desencadenar la liberación de electrones secundarios, parte del haz es reflejado o absorbido por la muestra. En el caso de los equipos convencionales, las muestras celulares necesitan estar recubiertas con un metal conductor para evitar la acumulación de carga, que interferiría con el haz de electrones distorsionando la imagen. Los microscopios electrónicos de barrido de última generación, por el contrario, permiten la observación de muestras biológicas sobre sustratos aislantes sin necesidad de aplicar recubrimientos metálicos. Esto es posible gracias a la utilización de potenciales muy bajos (> 1 kV) que permiten mantener la integridad de la muestra y reducen la acumulación de carga (Wuhrer y Moran, 2016). En este trabajo, hemos desarrollado un protocolo de CLEM (*Correlative Light and Electron Microscopy*) que permite observar la misma estructura mediante microscopía confocal y VLV-SEM (*Very Low Voltage – SEM*) sin necesidad de utilizar un equipo diseñado para tal efecto (ver sección de métodos). Para analizar la morfología del remanente del cuerpo medio mediante CLEM, se utilizaron células MDCK que expresaban de manera estable GFP-tubulina para localizar las estructuras de interés (Fig. R-3).

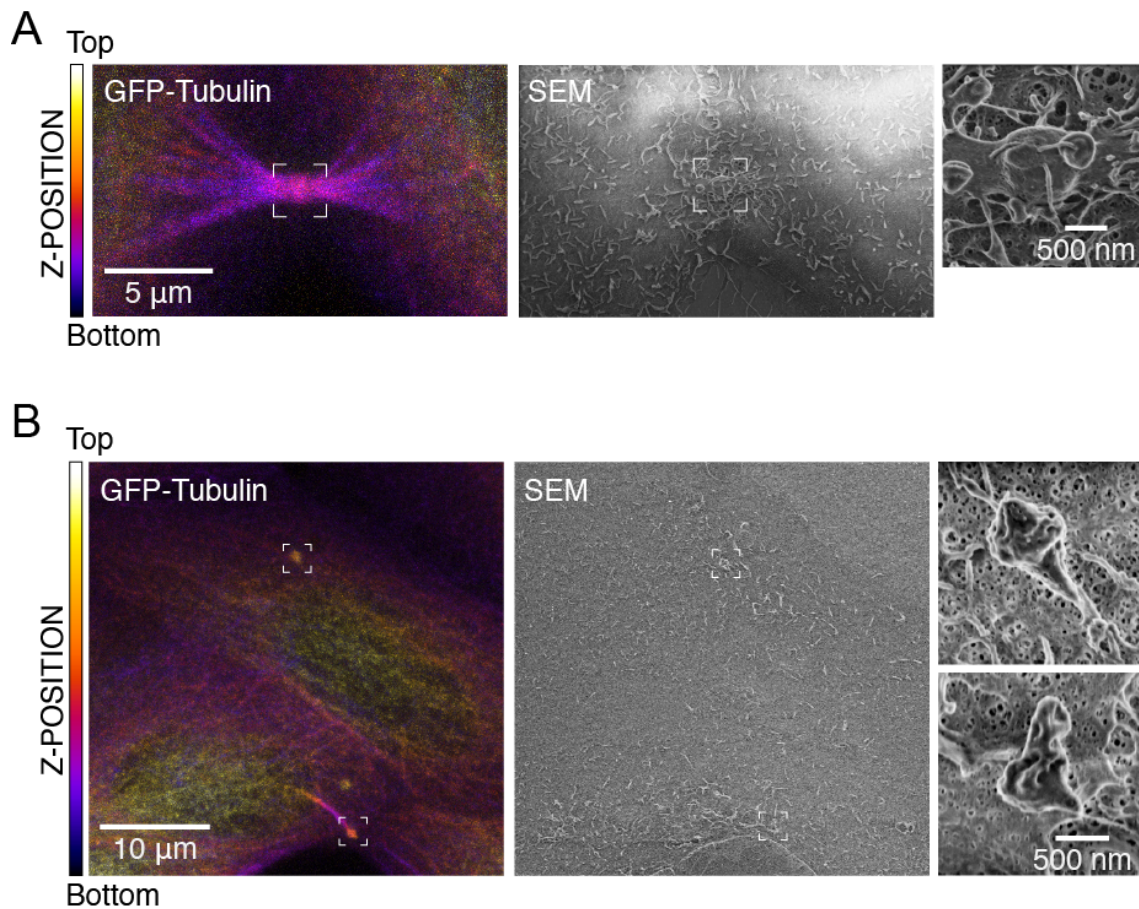


Figura R-3. Ejemplos de identificación de cuerpos medios y remanentes mediante CLEM. Observación de un cuerpo medio intacto (A), un intermediario de abscisión (B, abajo) y un remanente (B, arriba) mediante CLEM. Las mismas estructuras fueron identificadas mediante microscopía confocal (panel izquierdo) para ser posteriormente observadas mediante SEM (panel central y derecho). Se ha aplicado a las imágenes de confocal la escala de falso color indicada para representar la profundidad.

Utilizando CLEM, se seleccionaron 117 estructuras candidatas a ser remanentes y se adquirió una imagen de SEM de cada una de ellas. 87 de estas estructuras (un 74%) presentaban una morfología compatible con la de un remanente del cuerpo medio, con una zona central engrosada correspondiente al cuerpo de Flemming flanqueada por dos estructuras cónicas similares a las observadas mediante microscopía confocal de súper resolución (Fig. R-4A). El microscopio utilizado permite la inclinación y posterior rotación de la muestra, lo que hace posible la observación de las estructuras desde múltiples ángulos (Fig. R-4B).

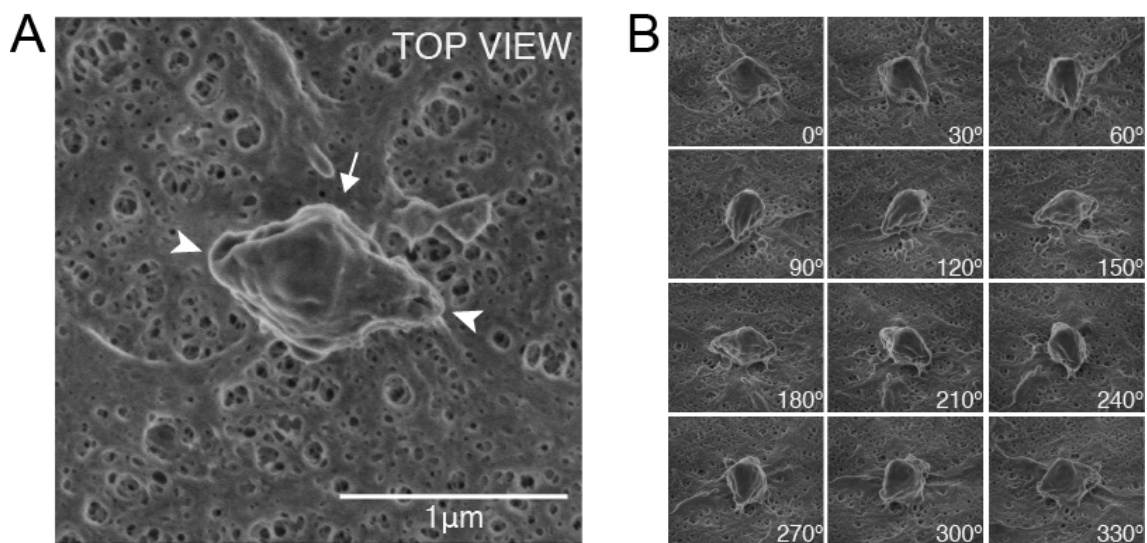


Figura R-4. El remanente del cuerpo medio puede observarse mediante SEM sobre la superficie apical de las células MDCK. Vista apical de un remanente (A) y serie de imágenes obtenidas mediante inclinación y rotación de la muestra (B). La flecha en (A) corresponde al cuerpo de Flemming, las cabezas de flecha señalan los extremos de la estructura. Los números en (B) indican el ángulo de rotación de la muestra.

En 17 de los 87 casos analizados, el remanente aparece simplemente “posado” sobre la membrana plasmática. En 45 de ellos, sin embargo, las imágenes de SEM muestran una clara continuidad entre la membrana del remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática (Fig. R-5). La conexión entre ambas estructuras se origina en la punta de uno de los conos que flanquean al cuerpo de Flemming.

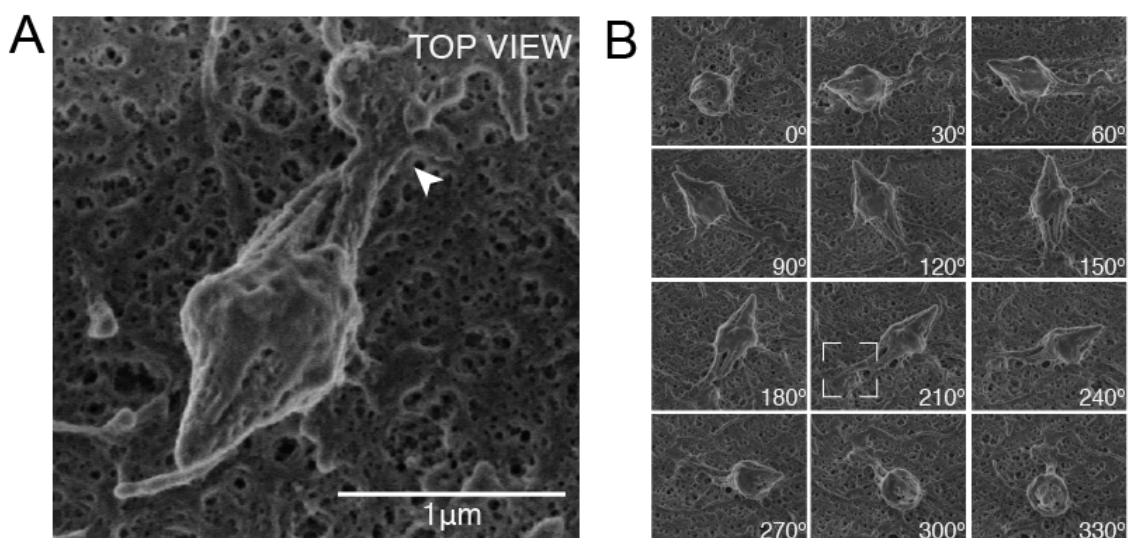
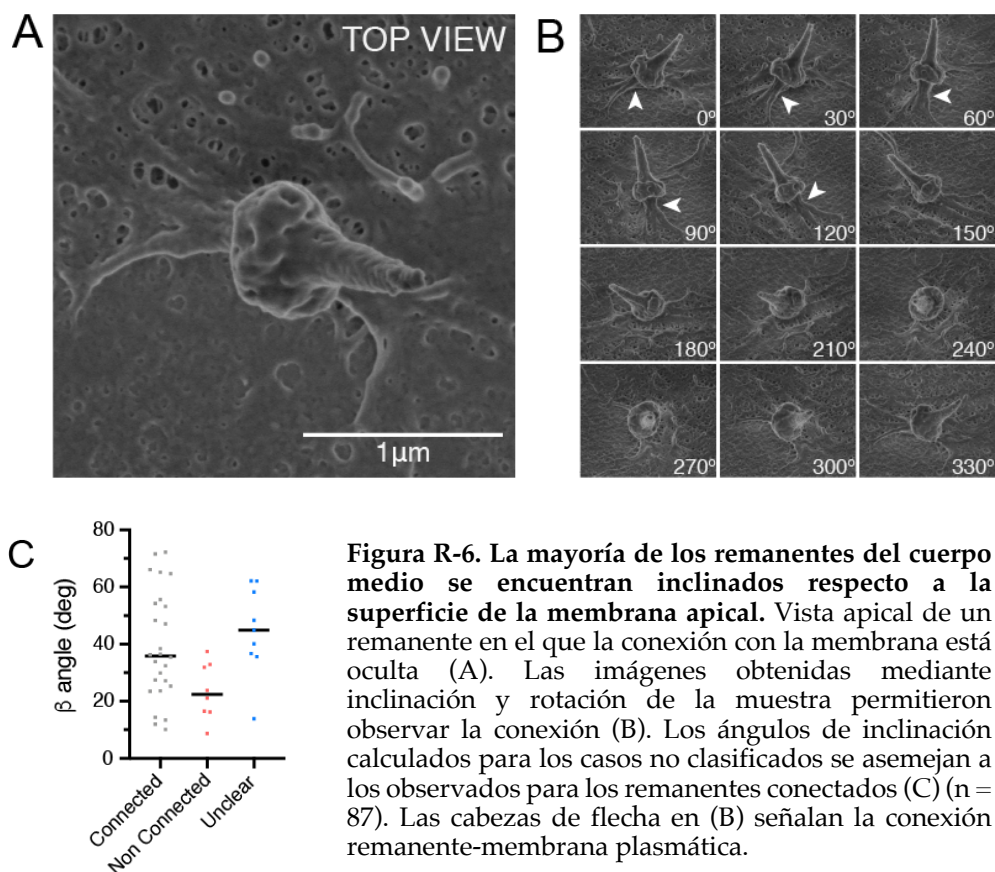


Figura R-5. La membrana del remanente del cuerpo medio presenta continuidad con la membrana plasmática en la mayoría de las estructuras analizadas. Vista apical de un remanente (A) y serie de imágenes obtenidas mediante inclinación y rotación de la muestra (B). La cabeza de flecha en (A) indica el punto de conexión del remanente con la membrana plasmática. Los números en (B) indican el ángulo de rotación de la muestra.

El ángulo de inclinación que presentan algunas de las estructuras analizadas impidió la observación de ambos conos en una única imagen apical (Fig. R-6A). Esta limitación técnica impide determinar la existencia de la conexión en 25 de las 87 estructuras analizadas, que se denominaron “no clasificables”. La inclinación y posterior rotación de la muestra efectuada en algunos de estos casos, sin embargo, permitió observar el punto de conexión que se encontraba oculto en la vista apical (Fig. R-6B). La cuantificación del ángulo de inclinación de estas estructuras arrojó como resultado valores cercanos a la horizontalidad para los remanentes no conectados, mientras que los conectados tendían a presentar inclinaciones mayores debido a la propia existencia de la conexión. Los casos no clasificables, como era de esperar, presentaron ángulos de inclinación muy pronunciados causados, presumiblemente, por la presencia de una conexión oculta (Fig. R-6C). Estas observaciones sugieren que la proporción de remanentes que presentan una conexión con la membrana plasmática es probablemente superior a nuestra estimación (73%, 45 de un total de 62 estructuras clasificadas).



Por lo tanto, a la vista de estos resultados, la presencia de una conexión membranosa entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática de la célula que lo hereda es una característica morfológica de la mayoría de los remanentes.

3.- Los remanentes del cuerpo medio presentan ciertas características morfológicas comunes

El elevado número de estructuras analizadas mediante CLEM nos permitió llevar a cabo un análisis morfológico más detallado del remanente del cuerpo medio. Una característica morfológica evidente es la degeneración de uno de los conos que conforman la estructura. Presenten o no una conexión con la membrana, en la mayoría de los casos (65% y 87% respectivamente) uno de los conos es visiblemente mayor que el otro, dando lugar a un remanente asimétrico (Fig. R-7A). Entre los remanentes conectados, cabe destacar además que la conexión surge preferentemente (86%) del cono que retiene su forma. Por tanto, y teniendo en cuenta únicamente aquellas estructuras completamente caracterizadas, la morfología más frecuente es la de un remanente conectado a la membrana plasmática mediante una conexión que surge de una estructura cónica no degenerada (63%, 31 de un total de 49) (Fig. R-7B).

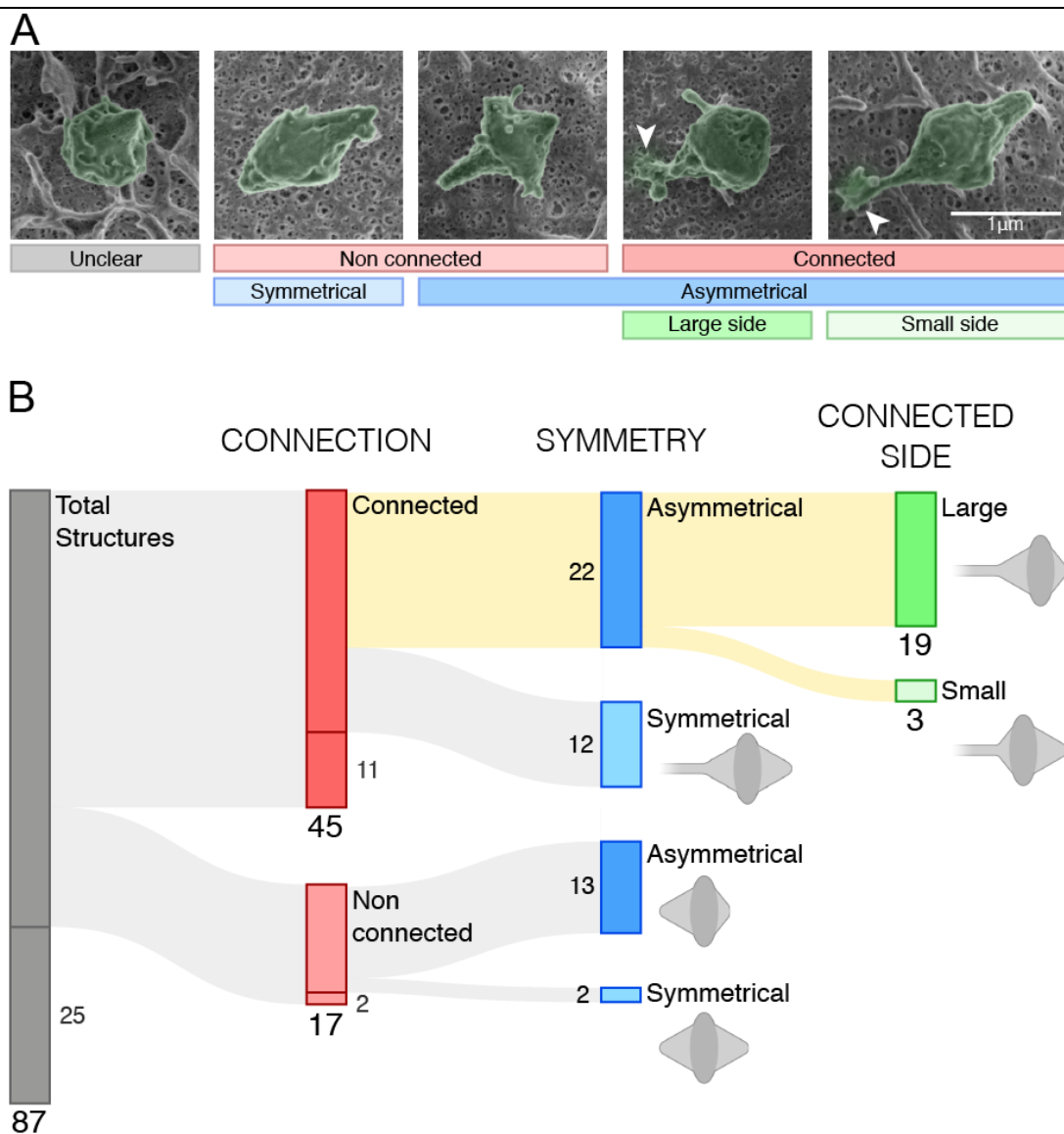


Figura R-7. Los remanentes del cuerpo medio presentan morfologías variadas. (A) Ejemplos representativos de las morfologías descritas, las cabezas de flecha indican la conexión remanente-membrana plasmática. (B) Resultados de la clasificación morfológica de los remanentes. Las cifras indican el número de estructuras incluidas en cada categoría (n = 87).

La presencia o ausencia de la conexión, unida a la asimetría entre ambos lados del remanente, afectan a su longitud total. Para poder estimar las medidas reales a partir de vistas apicales hemos corregido las mediciones obtenidas a partir de las imágenes según la inclinación de cada estructura (ver sección de métodos). Los resultados de este análisis ponen de manifiesto una uniformidad en la anchura del cuerpo de Flemming (mediana = 0.75 μm , rango intercuartílico (IQR) = 0.14 μm) que contrasta con la longitud total de la estructura (Fig. R-8A). Los remanentes que presentan conexión con la membrana plasmática tienen una longitud mayor y más variable (mediana = 1.49 μm , IQR = 1.61 μm) que los no conectados (mediana = 1.12 μm , IQR = 0.22 μm). Estas diferencias se deben no sólo a la presencia de la conexión, sino también a la diferencia en longitud existente entre el lado conectado (mediana = 0.84 μm , IQR = 0.56 μm) y el no conectado de la estructura (mediana = 0.56 μm , IQR = 0.36 μm) (Fig. R-8B).

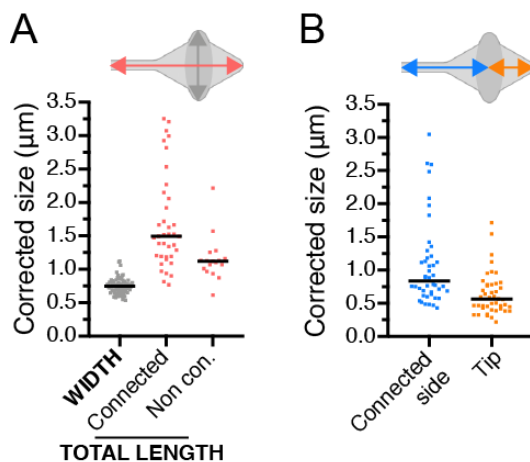


Figura R-8. El remanente del cuerpo medio presenta una anchura conservada pero una longitud variable. (A) Cuantificación de la anchura (n = 87) y de la longitud total de remanentes conectados (n = 38) y no conectados (n = 17). (B) Longitud de los dos lados de la estructura en remanentes conectados (n=38). Las barras horizontales representan la mediana.

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de heterogeneidad en las dimensiones del remanente del cuerpo medio. Esta variabilidad de tamaño, sin embargo, es compatible con ciertas características comunes a la mayoría de estructuras, como son su morfología general y su conexión con la membrana plasmática.

4.- La existencia de la conexión restringe el movimiento del remanente del cuerpo medio *in vivo*

El pequeño tamaño de la conexión membranosa observada mediante CLEM y su cercanía a la membrana plasmática impiden su observación mediante microscopía confocal, haciendo imposible su estudio en célula viva en ausencia de un marcador específico. La presencia de la conexión, sin embargo, podría restringir el movimiento del remanente de una forma muy característica. En lugar de flotar libremente en el medio extracelular, un remanente del cuerpo medio anclado a la membrana por un único punto debería de moverse dentro de un volumen definido, con forma de embudo, cuyo “cuello” señalaría el punto de conexión (Fig. R-9A).

Con el objetivo de corroborar la existencia de la conexión entre el remanente y la membrana plasmática en células vivas y de manera independiente a las observaciones mediante CLEM, analizamos el movimiento de estas estructuras mediante videomicroscopía. Utilizando de nuevo células que expresan de manera estable GFP-tubulina, registramos el movimiento tridimensional del remanente del cuerpo medio durante 3 min. De acuerdo con las predicciones, los resultados obtenidos en estos experimentos ponen de manifiesto un patrón de movimiento rápido, pero restringido a una pequeña región circular de la membrana plasmática (Fig. R9-B), que analizado en tres dimensiones, define un volumen de confinamiento con forma de embudo (Fig. R-9C, Video 1).

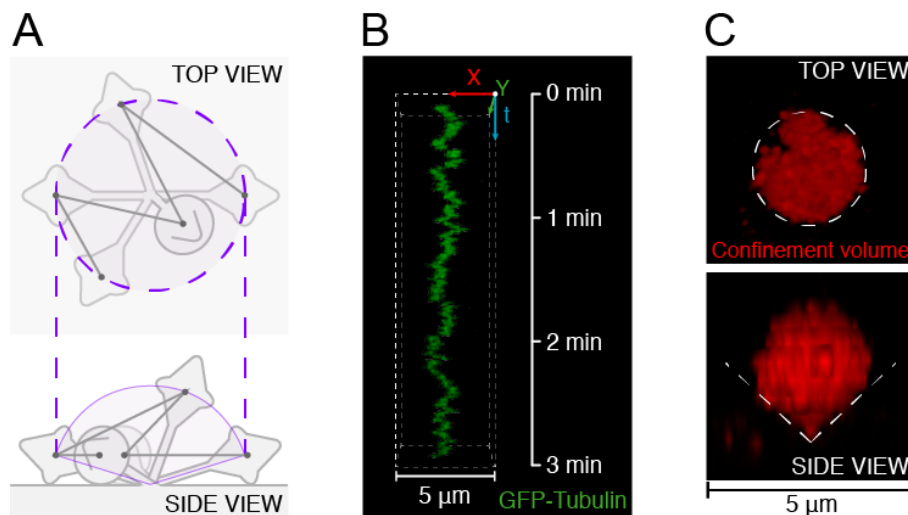


Figura R-9. La conexión con la membrana plasmática restringe el movimiento del remanente del cuerpo medio en células vivas. Representación gráfica del patrón de movimiento esperado para un remanente del cuerpo medio con un único punto de conexión a la membrana (A). Trayectoria seguida por un remanente durante 3 min (B). Representación gráfica, en vista apical (arriba) y lateral (abajo), del volumen de confinamiento delimitado por el movimiento tridimensional del remanente (C).

Para determinar si el área de confinamiento observada es compatible con las medidas directas obtenidas por SEM llevamos a cabo un análisis cuantitativo del movimiento de estas estructuras. Para convertir cada experimento de videomicroscopía en una única cifra que permita un análisis estadístico, se determinó en primer lugar la posición del punto de máxima intensidad (presumiblemente el cuerpo de Flemming) en cada cuadro. Una vez obtenida la trayectoria de la estructura, se calculó el centro geométrico de ésta, y a partir de él, un círculo que contiene el 95% de los puntos de la trayectoria (Fig. R-10A). Según nuestra hipótesis, el radio del área circular definida por el movimiento del remanente debería de tener unas dimensiones comparables a la distancia entre el punto de anclaje y el centro del cuerpo de Flemming. La comparación de estas dos medidas, obtenidas mediante técnicas completamente independientes, arrojó resultados muy similares (mediana = 0.66 μm e IQR = 2.26 μm para la medida directa y mediana = 0.69 μm , IQR = 1.6 μm para la estimación mediante análisis del movimiento) (Fig. R-10B). Por el contrario, el análisis de la trayectoria seguida por remanentes que flotan libremente en el medio extracelular resultó en áreas de confinamiento varios órdenes de magnitud mayores a los observados para estructuras conectadas (mediana = 13.89 μm , IQR = 19.75 μm) (Fig. R-10C).

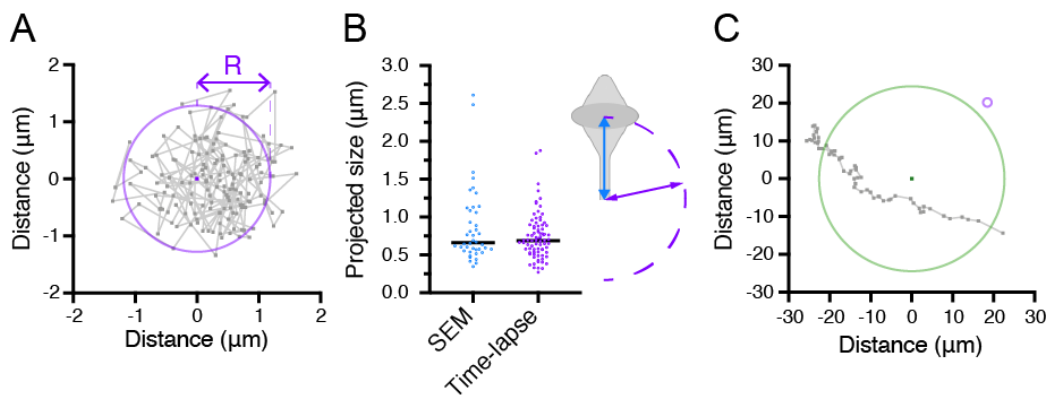


Figura R-10. El radio del área de confinamiento de los remanentes coincide con la distancia entre el punto de origen de la conexión y el cuerpo de Flemming. (A) Ejemplo de trayectoria seguida por un remanente, el punto púrpura señala el centro de la trayectoria, mientras que el círculo engloba el 95% de los puntos. (B) Comparación de la distancia medida por SEM entre el origen de la conexión y el cuerpo de Flemming ($n = 42$) con el valor obtenido mediante análisis del área de confinamiento ($n = 81$). (C) Ejemplo de trayectoria seguida por un remanente flotando libremente en el medio extracelular, el diámetro del círculo púrpura es el mismo que en (A).

En conjunto, estos resultados evidencian un patrón de movimiento rápido pero confinado de los remanentes del cuerpo medio sobre la membrana plasmática. La forma del volumen de confinamiento, junto con los valores calculados mediante el análisis de las trayectorias seguidas por estas estructuras, son consistentes con la existencia de una conexión remanente-membrana plasmática también en células vivas.

5.- El remanente del cuerpo medio tiene propiedades de compartimento celular independiente

Una vez establecida la continuidad de membranas entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática, el siguiente paso fue determinar si el interior de la estructura está comunicado con el citosol. Para ello se utilizó la técnica FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), que permite analizar la movilidad de proteínas fluorescentes en células vivas mediante el blanqueo de una pequeña región seguido del análisis de la recuperación de la fluorescencia. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron células MDCK que expresan de manera estable GFP-tubulina, que permite localizar las estructuras de interés, y la proteína fluorescente mScarlet, que se encuentra soluble en el citosol y con la que se lleva a cabo el ensayo de FRAP. En primer lugar, se determinó si la proteína mScarlet es capaz de atravesar el cuerpo medio cuando éste aún conecta las dos células hijas. Para ello se realizó el blanqueo del citosol de una de las células y se monitorizó la intensidad de fluorescencia de ambas a lo largo de 10 min (Fig. R-11A). La recuperación de la fluorescencia en la célula blanqueada en detrimento de su célula hermana demuestra la capacidad de la proteína mScarlet de atravesar las estructuras del cuerpo medio durante la citocinesis (Fig. R-11B,C).

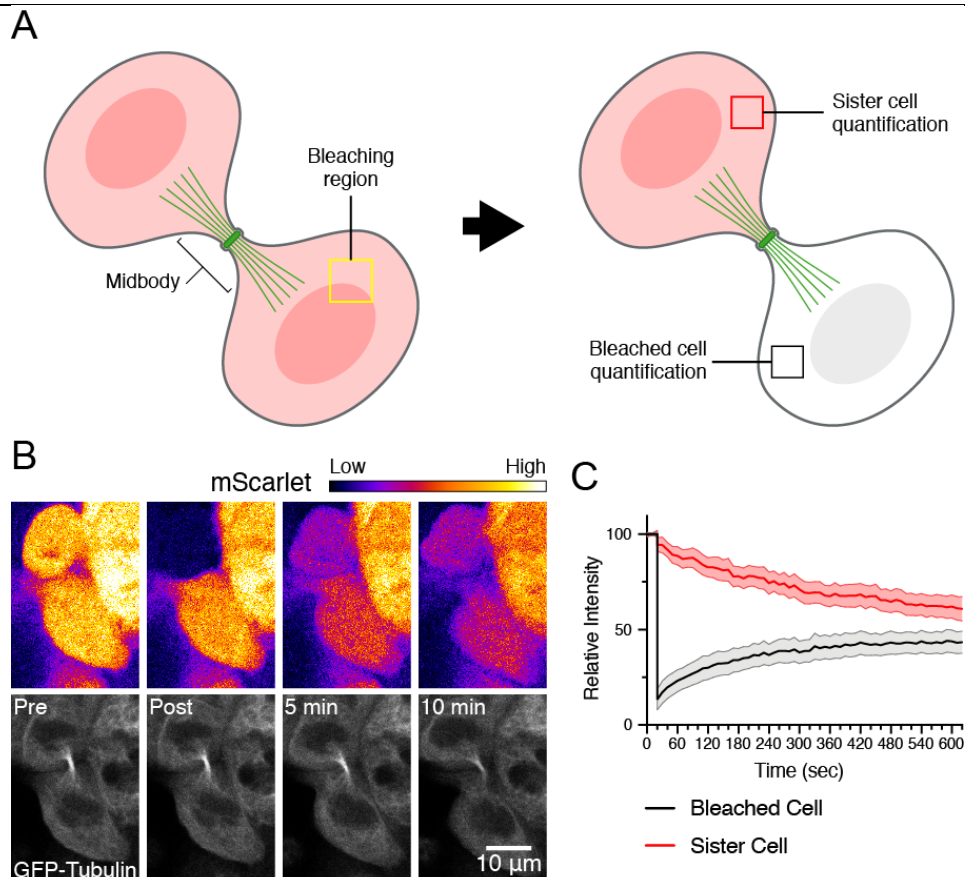
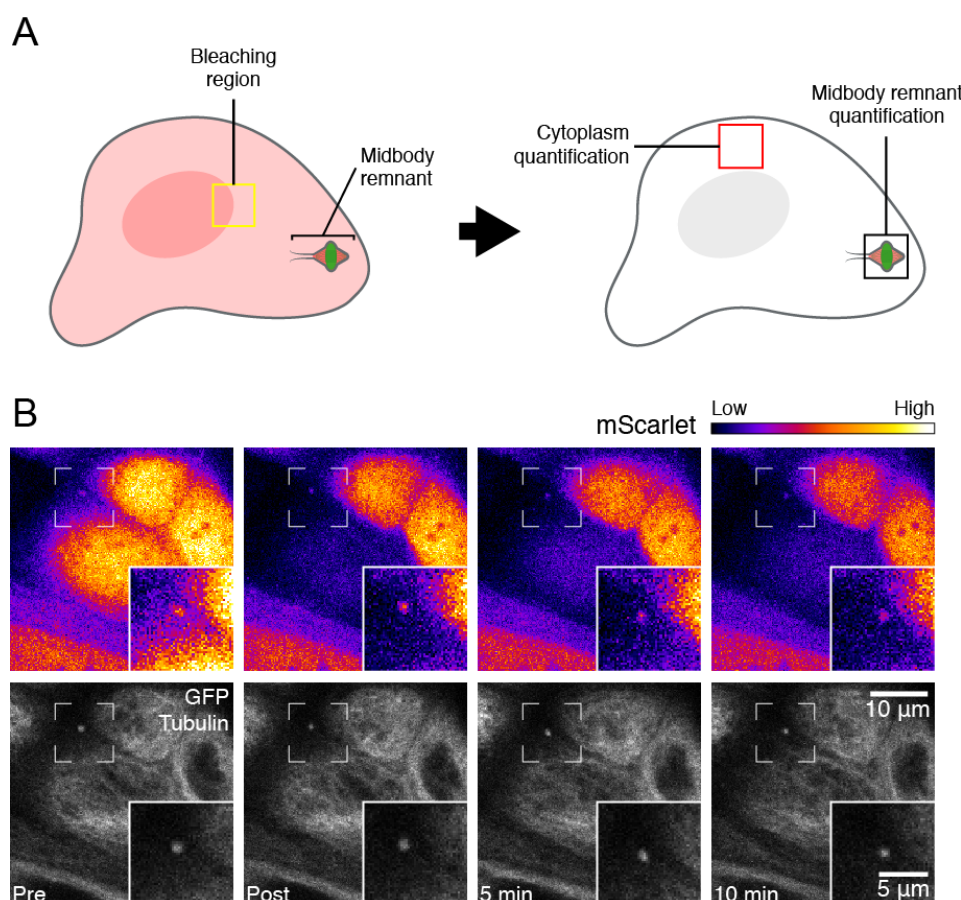


Figura R-11. La proteína mScarlet es capaz de difundir entre ambas células antes del proceso de abscisión. (A) Esquema que ilustra la estrategia utilizada para los ensayos de FRAP. (B) Imágenes representativas de uno de los experimentos; se indica la escala de falso color utilizada para la señal de mScarlet, los números corresponden al tiempo transcurrido tras el fotoblanqueo. (C) Resultado de la cuantificación de la intensidad de mScarlet en las dos células hijas, se representa media \pm SEM de la fluorescencia relativa al máximo pre-blanqueo de 9 células provenientes de 3 experimentos independientes.

El análisis de los remanentes requirió un cambio de estrategia. El registro de la intensidad de fluorescencia en estas estructuras tras su blanqueo se vería eclipsado por la señal de la proteína mScarlet presente en el citosol debido a la proximidad de éste. Mediante una técnica de “FRAP inverso” se llevó a cabo el blanqueo del citosol, y se analizó a continuación la evolución de la señal en el remanente (Fig. R-12A). Debido al reducido tamaño de esta estructura, de haber comunicación entre su interior y el citosol, la proteína mScarlet presente en el remanente difundiría rápidamente hacia el cuerpo celular. El análisis mediante esta técnica de remanentes que presentan un patrón de movimiento confinado ilustra cómo el remanente del cuerpo medio retiene la fluorescencia a lo largo de todo el experimento, lo que descarta la comunicación entre ambos compartimentos (Fig. R-12B,C).



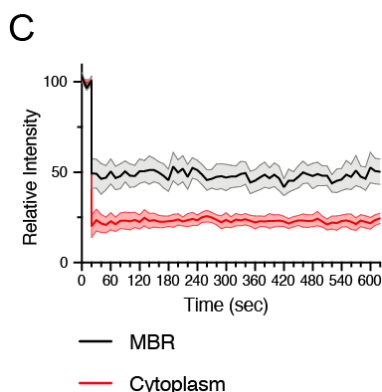


Figura R-12. La proteína mScarlet es incapaz de atravesar la unión entre el remanente y el cuerpo celular. (A) Esquema que ilustra la estrategia utilizada para los ensayos de FRAP. (B) Imágenes representativas de uno de los experimentos; se indica la escala de falso color utilizada para la señal de mScarlet, los números corresponden al tiempo transcurrido tras el fotoblanqueo. (C) Resultado de la cuantificación de la intensidad de mScarlet en las dos células hijas, se representa media \pm SEM de la fluorescencia relativa al máximo pre-blanqueo de 8 células provenientes de 3 experimentos independientes.

En conclusión, estos datos demuestran que, pese a ser capaz de atravesar las estructuras del cuerpo medio con libertad durante el proceso de citocinesis, la proteína mScarlet es incapaz de atravesar la unión entre el remanente y el cuerpo celular, lo que identifica al remanente del cuerpo medio como un compartimento celular independiente.

6.- La maquinaria ESCRT sigue la misma dinámica durante el primer y segundo evento de abscisión

Los resultados expuestos hasta ahora ponen de manifiesto la existencia de una conexión membranosa entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática de la célula que lo hereda. Esta conexión surge del extremo de uno de los conos que conforman el remanente, y coincide con el sitio del segundo evento de abscisión. Durante nuestro estudio de CLEM, así como en los análisis mediante videomicroscopía y los experimentos de FRAP, hemos seleccionado únicamente aquellas estructuras en las que el marcaje de tubulina ya no presentaba continuidad con el cuerpo celular. Esto nos indica que, aunque los microtúbulos hayan sido completamente eliminados durante el segundo evento de abscisión, el proceso de escisión de la membrana plasmática no ha tenido lugar en uno de los lados del cuerpo de Flemming. Para determinar la causa de este fenómeno de abscisión incompleta decidimos estudiar la localización de la maquinaria encargada de este proceso: el complejo ESCRT-III.

Aunque existen multitud de trabajos que analizan la implicación de la maquinaria ESCRT en la citocinesis, la inmensa mayoría de ellos se centran únicamente en el primer evento de abscisión, puesto que es suficiente para la separación de las células hijas y pone fin al proceso de división celular (Elia et al., 2011). Para analizar la dinámica del complejo ESCRT-III durante el segundo evento hemos utilizado proteínas de fusión GFP de las subunidades CHMP4B y CHMP4C (Fig. R-13A), así como anticuerpos contra otros componentes del complejo (Fig. R-13B).

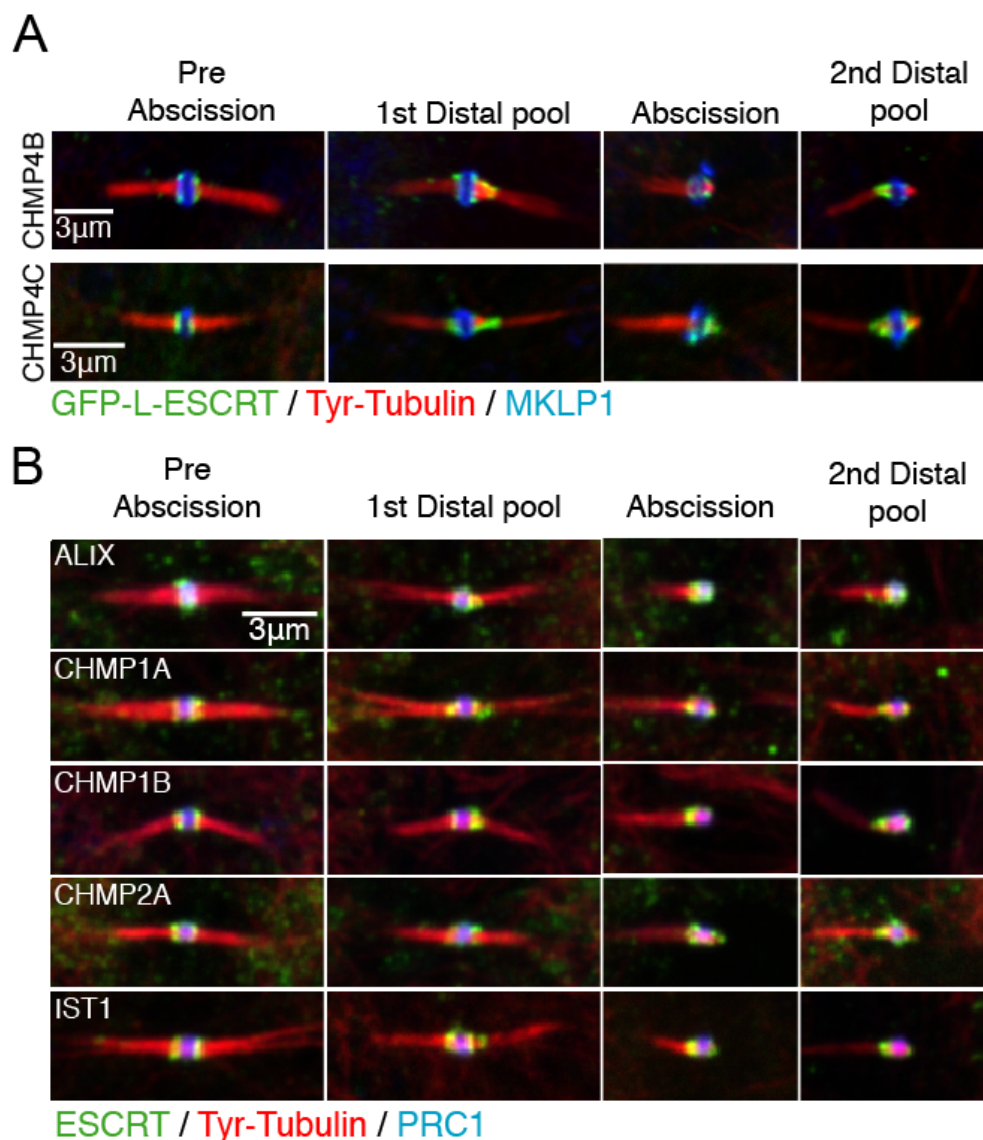


Figura R-13. Localización de la maquinaria ESCRT durante el proceso de abscisión. Análisis de la distribución de proteínas del complejo ESCRT en las distintas fases del proceso de abscisión. Imágenes obtenidas mediante expresión de formas de fusión GFP (A) e inmunofluorescencia indirecta (B).

El proceso de abscisión comienza con el reclutamiento de todas las proteínas analizadas a ambos lados del cuerpo de Flemming, dando lugar a la aparición de dos acúmulos con forma de anillo que flanquean la estructura (Fig. R-13, primera columna). La polimerización de un filamento helicoidal de ESCRT partiendo de uno de estos acúmulos produce el estrechamiento del correspondiente brazo del cuerpo medio. Debido al límite de resolución del equipo utilizado, esto se traduce en la aparición de un patrón aparentemente cónico que se extiende desde el cuerpo de Flemming hacia uno de los brazos (Fig. R-13, segunda columna). El punto de máxima constricción generado por este polímero determina el sitio del primer evento de abscisión. Una vez los

microtúbulos y la membrana han sido escindidos en uno de los brazos, éste es rápidamente degradado. El polímero de ESCRT causante de este proceso también degenera, dando lugar a un acúmulo puntual o un patrón anular similar al de los primeros estadios del proceso (Fig. R-13, tercera columna). La misma secuencia de eventos se repite a continuación al otro lado del cuerpo de Flemming; la formación del polímero helicoidal de ESCRT constriñe el brazo restante y señala el lugar del segundo evento de abscisión (Fig. R-13, cuarta columna).

A la vista de estos resultados, en células MDCK todas las proteínas del complejo ESCRT-III analizadas siguen la dinámica descrita para el primer evento de abscisión. A la hora de llevar a cabo el segundo evento, el reclutamiento y polimerización de la maquinaria ocurren de una manera similar. Los resultados previamente expuestos, sin embargo, sugieren que en el caso del segundo evento de abscisión la escisión de los microtúbulos no va acompañada del corte de la membrana. Por ello, decidimos centrarnos en analizar la localización del complejo una vez los microtúbulos han sido eliminados de la estructura, es decir, cuando ésta se ha convertido en un remanente.

7.- La maquinaria ESCRT se distribuye de forma desigual entre ambos lados del remanente

Todos los componentes del complejo ESCRT-III analizados, ya sea mediante ensayos de inmunofluorescencia contra la proteína endógena o a través de la expresión de fusiones con GFP, se encuentran presentes en los remanentes del cuerpo medio tras su herencia (Fig. R-14A). Aunque es posible encontrar casos en los que la maquinaria ESCRT presenta la misma localización a ambos lados del cuerpo de Flemming (Fig. R-14B), en la mayoría de los remanentes la distribución de estas proteínas no es simétrica (Fig. R-14C).

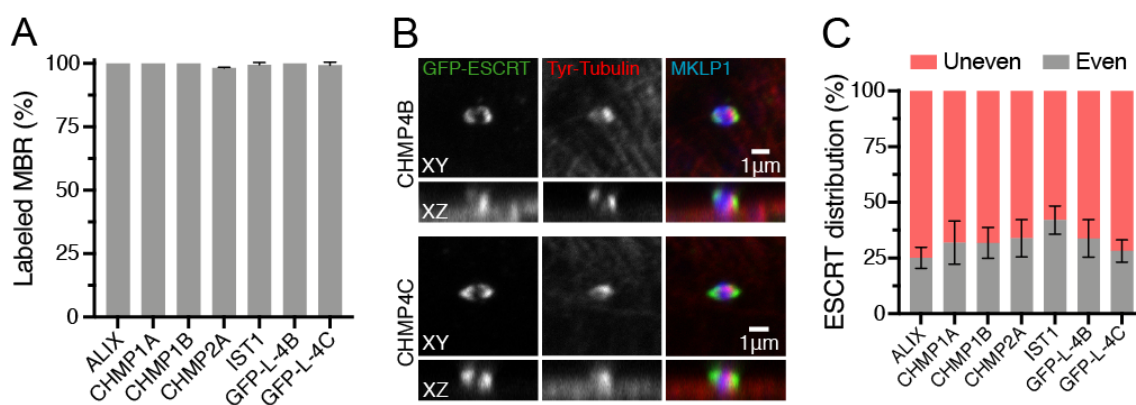


Figura R-14. Las proteínas del complejo ESCRT están presentes en la mayoría de los remanentes del cuerpo medio. (A) Cuantificación de la presencia de proteínas ESCRT en los remanentes. Se representa la media \pm SD del porcentaje de remanentes positivos con respecto al total de estructuras ($n > 35$ provenientes de 3 experimentos independientes). (B) Ejemplos representativos de distribución homogénea de las proteínas CHMP4B y CHMP4C a lo largo del remanente. (C) Cuantificación del patrón de ESCRT observado en los remanentes, se representa la media \pm SD del porcentaje de remanentes que muestran un patrón homogéneo o desigual con respecto al total de estructuras positivas ($n > 29$ provenientes de 3 experimentos independientes).

Mientras que a uno de los lados del cuerpo de Flemming la maquinaria adopta un patrón puntual o anular similar al observado tras el primer evento de abscisión, en el extremo opuesto se mantiene una distribución más propia de fases anteriores al corte. En estos casos, puede observarse un patrón cónico continuo o dos poblaciones aisladas que abarcan desde el cuerpo de Flemming hasta el extremo del cono de tubulina. Estos patrones corresponderían a un polímero helicoidal continuo de ESCRT-III o a una fase posterior en la que éste ha sido remodelado dando lugar a dos poblaciones diferenciadas respectivamente (Fig. R-15A). En algunos casos, la pequeña población de ESCRT observada en el extremo de la estructura aparece muy elongada, dando lugar a una estructura filamentosa, carente de microtúbulos pero positiva para ESCRT, muy similar a la conexión membranosa observada mediante SEM (Fig. R-15B).

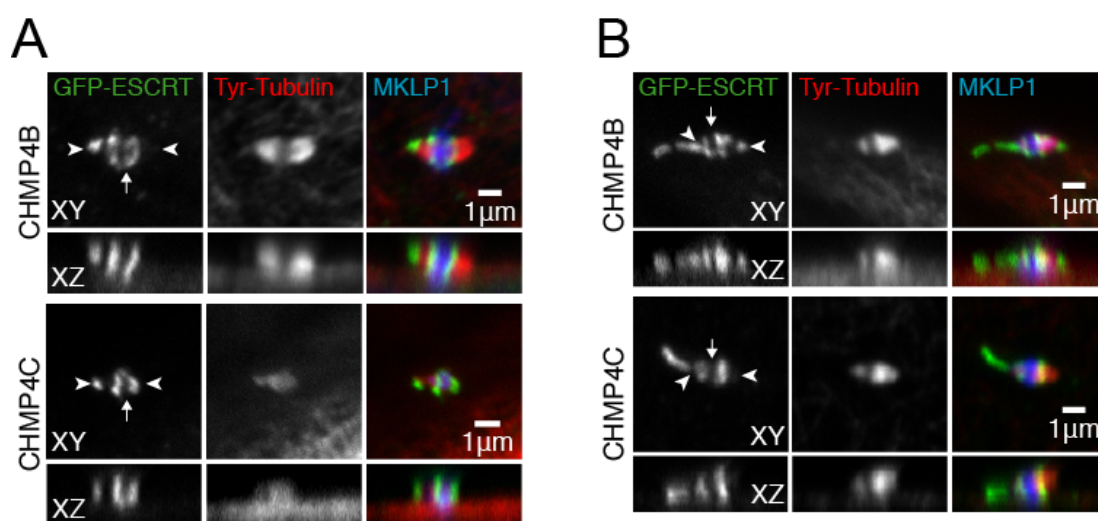


Figura R-15. El complejo ESCRT presenta una distribución típica de fases previas a la abscisión a uno de los lados del remanente. (A,B) Ejemplos representativos de distribución asimétrica del complejo ESCRT en los remanentes. Las proteínas del complejo forman a uno de los lados una segunda población alejada del cuerpo de Flemming (A) que, en ocasiones, aparece alargada dando lugar a un filamento negativo para tubulina (B).

En conjunto, estos resultados muestran que una vez el remanente ha sido heredado, la maquinaria ESCRT retiene la distribución típica de fases previas al proceso de escisión de membranas únicamente en uno de los lados del cuerpo de Flemming.

8.- La maquinaria ESCRT se concentra en el punto de conexión entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática

La presencia de polímeros de ESCRT-III propios de pasos anteriores a la abscisión a uno de los lados del remanente del cuerpo medio; unida a la similitud entre los filamentos positivos para ESCRT observados en algunos remanentes y las conexiones membranas identificadas mediante SEM, sugieren una posible relación entre ambas estructuras. Con el objetivo de explorar esta posibilidad llevamos a cabo un análisis mediante CLEM de la localización de ESCRT en los remanentes. Para realizar estos experimentos se utilizaron células MDCK que expresan de manera estable GFP-ESCRT (CHMP4B o CHMP4C) junto con Cherry-tubulina. Gracias al uso simultáneo de ambos marcadores hemos podido identificar las estructuras y analizar la distribución de ESCRT con respecto a la conexión membrana observada mediante SEM. Tanto para la subunidad estructural CHMP4B como para la proteína reguladora CHMP4C, el lado del remanente que presenta el polímero de ESCRT coincide con la conexión con la membrana plasmática (Fig. R-16).

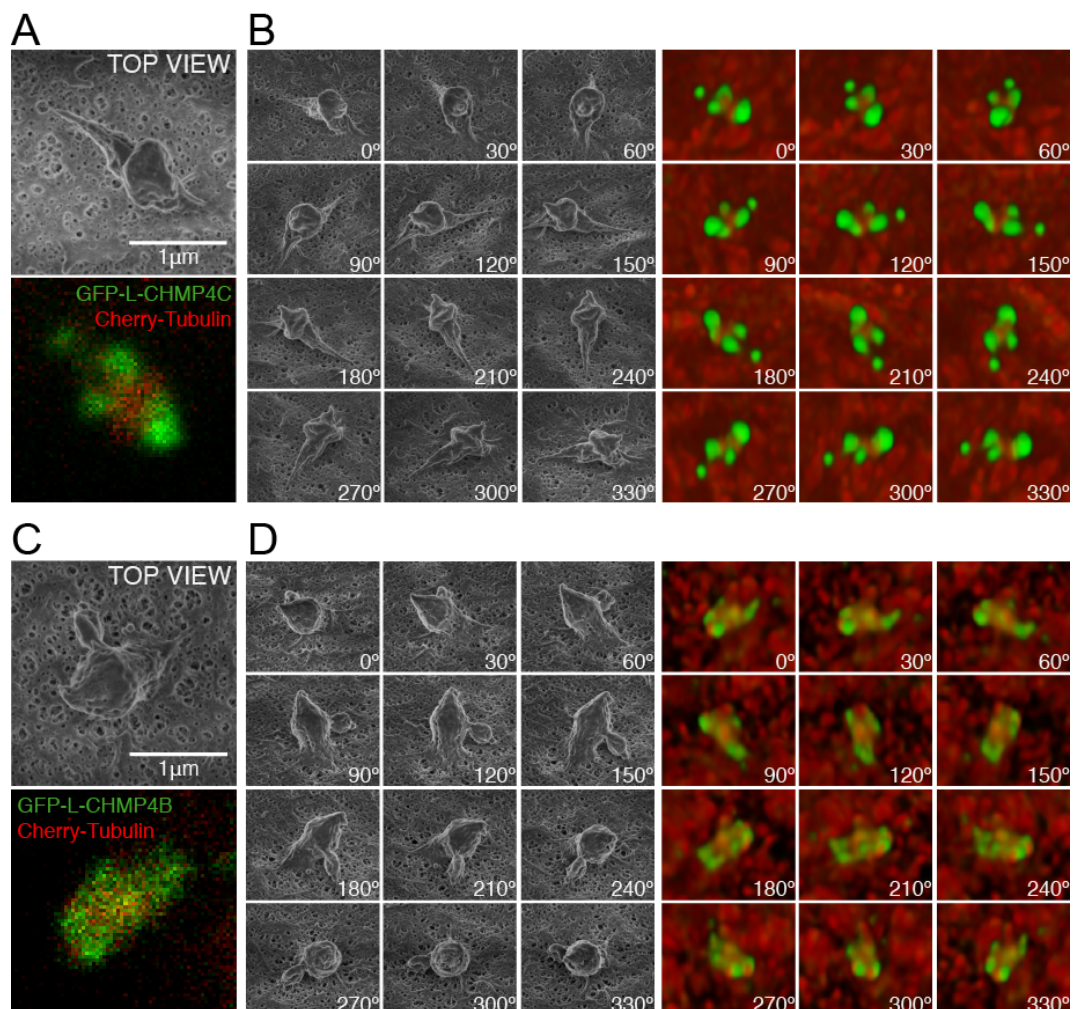


Figura R-16. El lado del remanente que presenta el polímero de ESCRT coincide con el lugar de origen de la conexión con la membrana plasmática. (A-D) Análisis mediante CLEM de la localización de GFP-L-CHMP4B (A,B) y GFP-L-CHMP4C (C,D) en el remanente del cuerpo medio. (A,C) Vista apical obtenida mediante SEM (panel superior) y microscopía confocal (panel inferior). (B,D) Serie de imágenes obtenida tras la inclinación y rotación de la muestra (panel izquierdo) y reconstrucción tridimensional de las imágenes de confocal correspondientes (panel derecho).

Aunque las limitaciones del protocolo de CLEM impiden determinar el punto exacto de la conexión en el que se acumula la maquinaria ESCRT, la observación de un número elevado de estructuras para ambos marcajes ($n > 16$) nos permite concluir que la práctica totalidad de los remanentes conectados a la membrana plasmática poseen un polímero de ESCRT-III en la conexión (Fig. R-17).

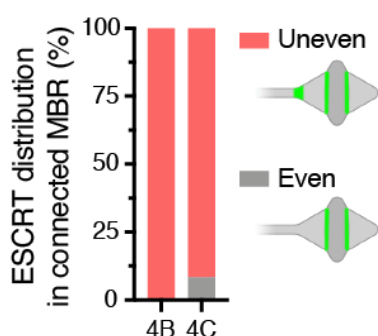


Figura R-17. Cuantificación de la distribución de ESCRT en la conexión membranosa. La mayoría de los remanentes que presentan conexión con la membrana plasmática tienen asociado al mismo extremo un polímero asimétrico de ESCRT. Se representa la media de los remanentes que cumplen esta descripción con respecto al total de estructuras ($n=16$ y 18 para CHMP4B y CHMP4C respectivamente).

Para determinar la presencia de polímeros de ESCRT-III en el lugar de la conexión de manera independiente volvimos a recurrir a los análisis mediante experimentos de video microscopía. Utilizando las células que expresan GFP-CHMP4C y Cherry-tubulina, analizamos la localización de la proteína CHMP4C con respecto al movimiento del remanente del cuerpo medio en células vivas. Durante estos experimentos, la porción más basal del marcaje de CHMP4C, que corresponde al polímero situado presumiblemente en la conexión, se mantuvo prácticamente inmóvil. El resto de la estructura, que comprende el cuerpo de Flemming positivo para Cherry-tubulina y la fracción de CHMP4C situada al otro lado de éste, se mueve alrededor de este punto fijo describiendo un círculo (Fig. R-18, Video 2).

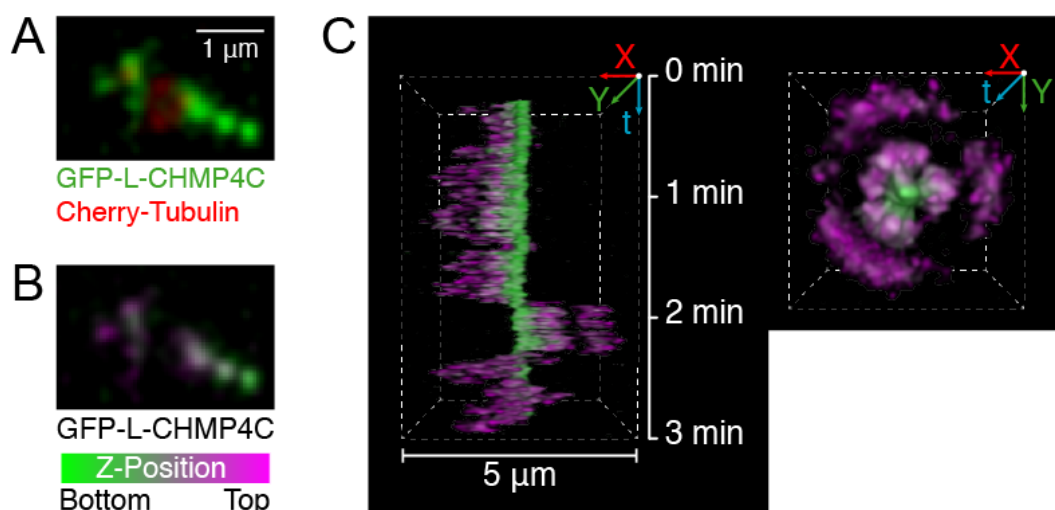


Figura R-18. La subunidad CHMP4C del complejo ESCRT-III señala la conexión entre el remanente y la membrana plasmática en células vivas. (A) Distribución de GFP-L-CHMP4C y Cherry-tubulina en el remanente de una célula viva. (B) Señal de GFP-L-CHMP4C codificada según la posición apico-basal, se indica la escala de color utilizada. (C) Reconstrucción tridimensional del movimiento seguido por el remanente durante 3 min. La porción más basal del marcaje de CHMP4C permanece inmóvil durante el experimento (panel izquierdo), mientras que el resto de la estructura se mueve circularmente en torno al punto fijo (panel derecho).

En conclusión, estos resultados indican mediante dos técnicas independientes la presencia de polímeros de ESCRT-III propios de fases previas a la abscisión en la conexión membranosa del remanente del cuerpo medio con la membrana plasmática.

9.- No existe intercambio de subunidades ESCRT entre el remanente y el cuerpo celular

Una vez determinada la presencia del complejo ESCRT-III en la conexión, decidimos analizar el posible recambio de subunidades del complejo dentro de esta estructura. A pesar de que los experimentos de FRAP indican que no existe difusión pasiva de proteínas entre el citosol y el interior del remanente, se ha descrito un intercambio activo de subunidades dentro de los filamentos de ESCRT mediado por la AAA-ATPasa VPS4 (Mierzwa et al., 2017). En este caso, y gracias a la especificidad del marcaje, se realizó un protocolo de FRAP convencional, fotoblanqueando la estructura de interés para cuantificar a continuación la recuperación de la fluorescencia en la misma (Fig. R-19). Utilizando células MDCK que expresan de manera estable GFP-ESCRT (CHMP4B o CHMP4C) junto con Cherry-tubulina hemos analizado mediante FRAP el recambio de subunidades del complejo ESCRT en el cuerpo medio antes de la abscisión y tras la herencia del remanente.

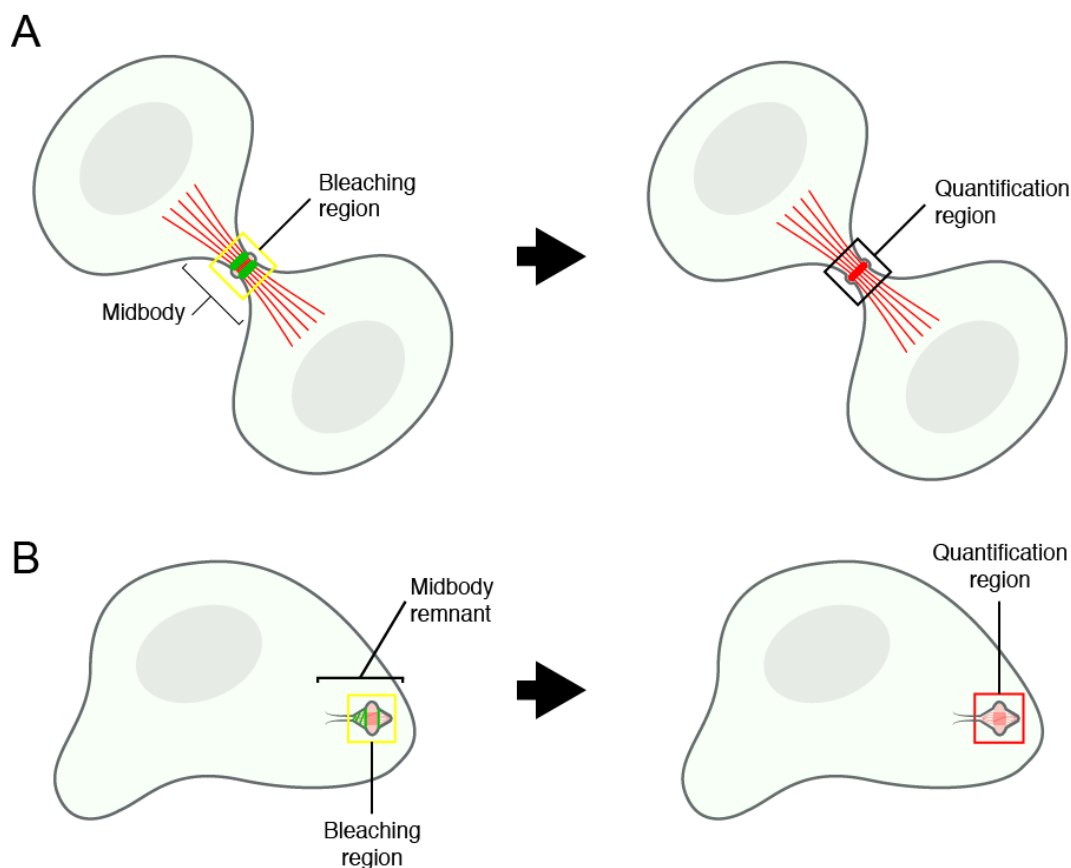


Figura R-19. Esquema que ilustra la estrategia seguida para los estudios mediante FRAP. Para el estudio de la movilidad de las proteínas del complejo ESCRT tanto antes (A) como después (B) del proceso de abscisión se llevó a cabo el fotoblanqueo de la estructura de interés, seguida del análisis de la recuperación de la fluorescencia en la misma región.

En primer lugar, y para corroborar las observaciones previas de otros grupos en nuestro modelo celular, se llevó a cabo el fotoblanqueo de los acúmulos anulares de ESCRT localizados a ambos lados del cuerpo de Flemming (Fig. R-19A). Tanto para CHMP4B (Fig. R-20A,C) como para CHMP4C (Fig. R-20D,F) se observó una recuperación total de la fluorescencia dentro del periodo de observación post-blanqueo. Este resultado, similar al previamente descrito en células HeLa (Mierzwa et al., 2017), confirma el dinamismo del complejo ESCRT en esta estructura en células MDCK. A continuación, se repitió el ensayo en remanentes del cuerpo medio que muestran un patrón de movimiento confinado con una conexión positiva para la proteína ESCRT correspondiente (Fig. R-19B). En este caso, el fotoblanqueo de los remanentes fue seguido de una ausencia total de recuperación de la fluorescencia tanto para CHMP4B (Fig. R-20B,C) como para CHMP4C (Fig. R-20E,F) dentro del periodo de observación.

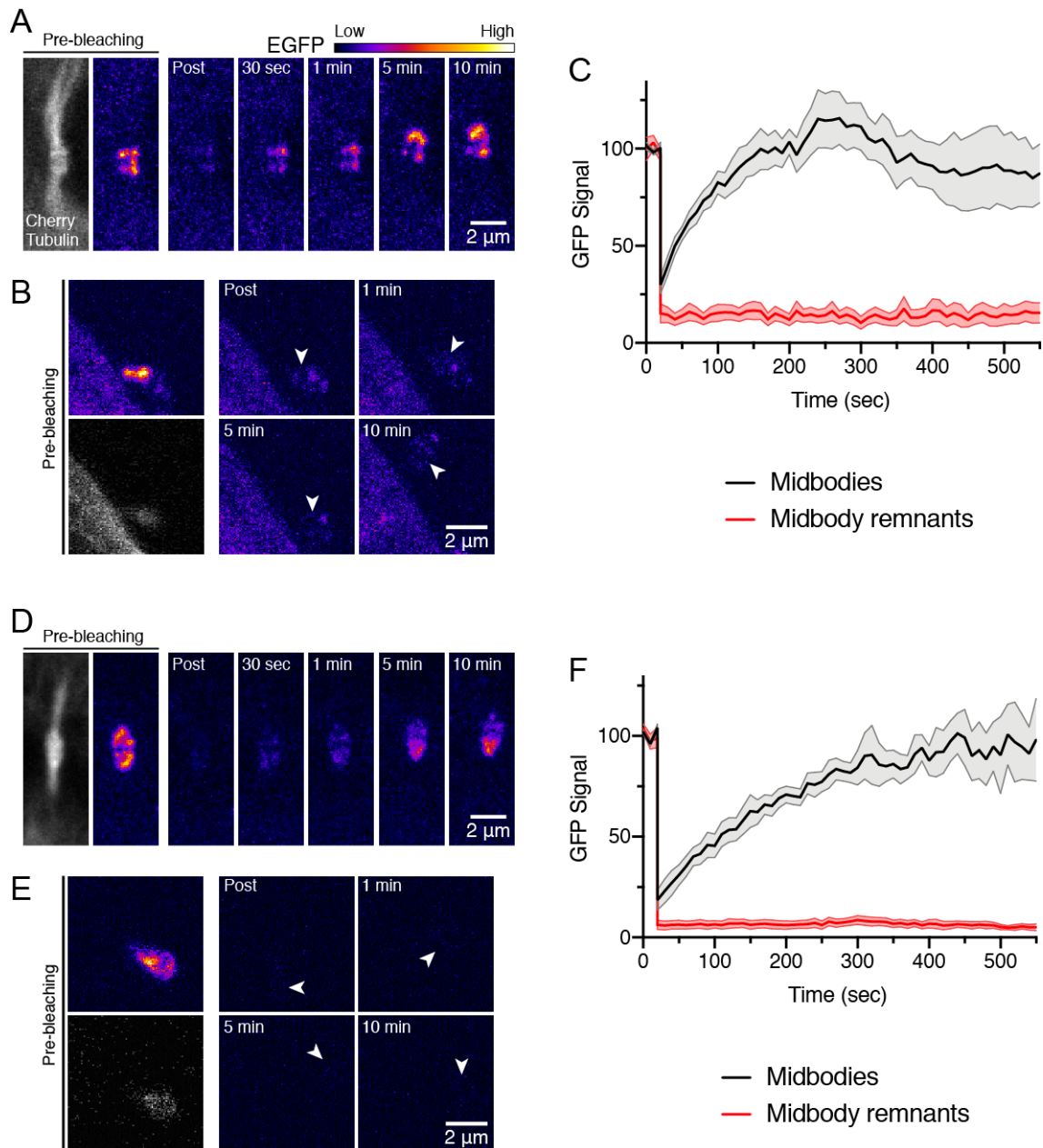


Figura R-20. Estudio de la movilidad de proteínas ESCRT mediante FRAP. Ejemplos representativos de la movilidad de las proteínas GFP-L-CHMP4B (A,B) y GFP-L-CHMP4C (D,E) antes del proceso de abscisión (A,D) y tras la herencia del remanente (B,E). (C,F) Análisis cuantitativo de la recuperación de la fluorescencia. Se representa el valor medio \pm SEM de la fluorescencia relativa al máximo pre-blanqueo ($n = 4, 6, 4$ y 9 células por orden de aparición) de 3 experimentos independientes. Las cabezas de flecha en B y E señalan la posición del cuerpo de Flemming.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que no existe intercambio de subunidades del complejo ESCRT-III entre el remanente del cuerpo medio y el citoplasma.

10.- El silenciamiento de CHMP4C acelera el proceso de abscisión en células MDCK

Debido a su carácter irreversible, el proceso de abscisión mediado por la maquinaria ESCRT está sujeto a una estricta regulación. Durante las últimas fases de la citocinesis, el denominado punto de control de abscisión se encarga de retrasar la escisión del cuerpo medio en respuesta a múltiples estímulos. La subunidad CHMP4C del complejo ESCRT-III juega un papel crucial en este proceso, sirviendo de intermediario entre las quinasas mitóticas y la maquinaria ESCRT. Nuestros ensayos mediante CLEM han localizado a CHMP4C en la conexión entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática. Dado que esta estructura se origina mediante un proceso de abscisión incompleta, la presencia de CHMP4C en la misma sugiere un posible papel para esta proteína en el mantenimiento de la integridad de la unión remanente-membrana.

Con el objetivo de explorar esta posibilidad, comprobamos en primer lugar el papel regulador de la proteína CHMP4C durante en primer evento de abscisión en células MDCK. Mediante el uso de un oligonucleótido de siRNA diseñado contra la región codificante del mRNA de CHMP4C (si4C), se llevaron a cabo ensayos de silenciamiento génico en células MDCK que expresan de manera estable una construcción GFP-tubulina. Tras la realización de ensayos de videomicroscopía con estas células se cuantificó el tiempo transcurrido entre el establecimiento del cuerpo medio y el primer evento de abscisión. La bajada en los niveles de CHMP4C observada mediante inmunodetección (Fig. R-21A,B), produjo una disminución del tiempo de abscisión en las células tratadas con el siRNA sin que la proliferación resultara afectada (Fig. R-21C-D). Esto indica que, en ausencia de CHMP4C, la capacidad de las células de activar el punto de control de abscisión se ve afectada, lo que desregula la actividad del complejo ESCRT-III en el cuerpo medio acelerando la resolución de la estructura.

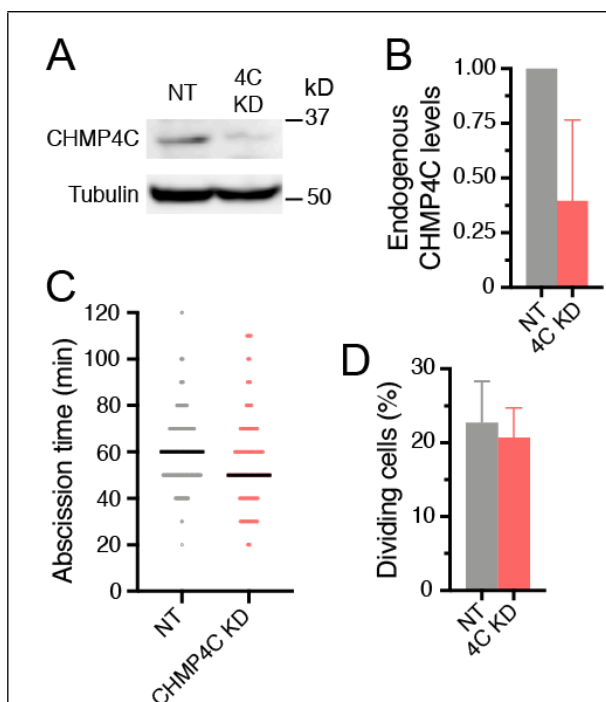
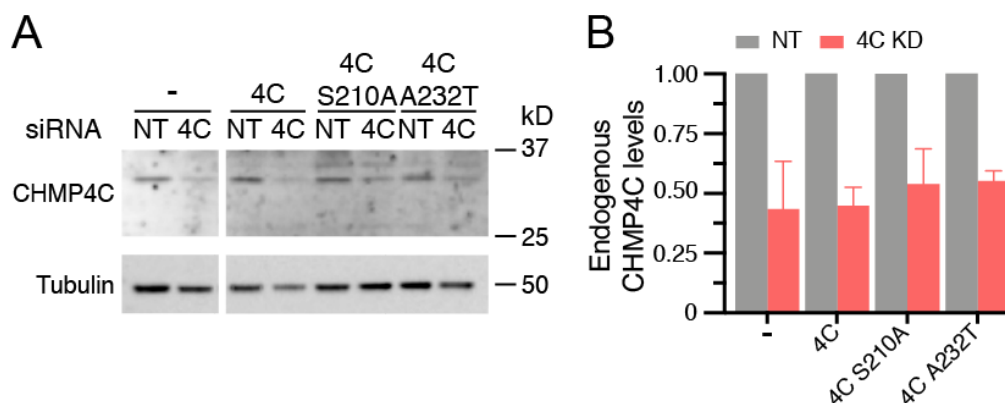


Figura R-21. Los niveles de la proteína CHMP4C se relacionan con el tiempo de abscisión en células MDCK. (A) Inmunoblot que muestra los niveles endógenos de la proteína CHMP4C y la bajada producida como consecuencia de la transfección de un siRNA específico contra el mRNA de CHMP4C (4C KD), pero no con un siRNA control (NT). Los niveles de tubulina se utilizaron como control de carga. (B) Cuantificación de los niveles de CHMP4C. Se presenta la media relativa al control de tres experimentos independientes. (C) La disminución de los niveles de CHMP4C acelera el proceso de abscisión. Se representa el tiempo entre el establecimiento del cuerpo medio y el primer evento de abscisión ($n > 27$ en tres experimentos independientes). (D) Proporción de células que entran en división con respecto al número inicial en los experimentos representados en C.

11.- La proteína CHMP4C es necesaria para la herencia del remanente del cuerpo medio

Una vez determinado el papel regulador de CHMP4C durante el primer evento de abscisión en células MDCK, pasamos a analizar su posible implicación en el evento de abscisión incompleto que da lugar a la unión remanente-membrana plasmática. El patrón de movimiento de los remanentes observado mediante videomicroscopía sugiere que la conexión observada por CLEM es su único punto de anclaje al cuerpo celular. Cualquier alteración del segundo evento de abscisión tendría por tanto repercusiones en la tasa de herencia del remanente.

Para analizar el papel de CHMP4C, se silenciaron células MDCK mediante el si4C (Fig. R-22A,B) y se cuantificó la proporción de células que retenían un remanente en su superficie tras 48 h. Como consecuencia de la disminución en los niveles de la proteína CHMP4C, se observó una bajada drástica en la proporción de células con remanente sin que la proliferación celular resultase afectada (Fig. R-22C,D). Para determinar la especificidad del fenotipo observado, se realizó el experimento de manera simultánea en células MDCK que expresan de manera estable una forma de GFP-CHMP4C resistente al si4C. En este caso, el número de remanentes fue similar al control, lo que sugiere un papel para CHMP4C en la retención del remanente.



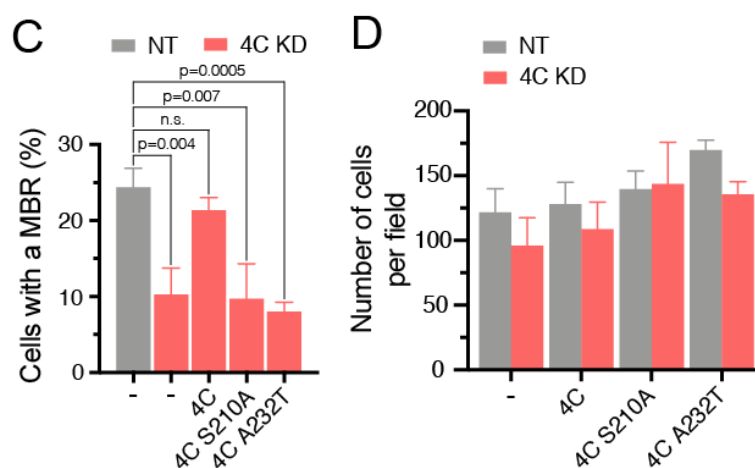


Figura R-22. La capacidad de la proteína CHMP4C de activar el punto de control de abscisión es necesaria para la herencia del remanente del cuerpo medio. (A) Inmunoblot que muestra los niveles de la proteína CHMP4C endógena en células control y las líneas transgénicas utilizadas, así como su bajada como consecuencia de la transfección con si4C pero no con un siRNA control (NT). (B) Cuantificación de los niveles de CHMP4C mostrados en el panel A. Se presenta la media relativa al control de tres experimentos independientes. (C) Efecto de los niveles de CHMP4C sobre la herencia del remanente del cuerpo medio. Se representa la proporción de células que poseen un remanente en superficie con respecto al total de células ($n > 800$ en tres experimentos independientes). (D) Análisis de la proliferación celular durante los experimentos presentados en el panel C. Se representa el número medio de células por campo. En C se indica el p-valor obtenido tras la comparación de los grupos indicados mediante la prueba *t* de Student.

Varios estudios han identificado la fosforilación de CHMP4C mediada por la quinasas Aurora B como crucial para la activación del punto de control de abscisión, siendo el residuo de serina en posición 210 (S210) el sitio fosfoaceptor principal (Capalbo et al., 2012; Carlton et al., 2012). El alelo CHMP4C A232T, cuya expresión se ha relacionado con mayor predisposición a varios tipos de cáncer, interacciona deficientemente con ALIX, y es incapaz de activar el punto de control de abscisión (Sadler et al., 2018). Con el fin de determinar si la capacidad de CHMP4C de activar el punto de control de abscisión participa también en la regulación de la herencia del remanente, llevamos a cabo experimentos de silenciamiento utilizando células MDCK que expresaban de manera estable los mutantes S210A y A232T de GFP-CHMP4C (Fig. R-23). Los niveles de expresión de los diferentes mutantes (Fig. R-23A), así como el número de remanentes del cuerpo medio positivos para los mutantes de S210A y A232T (Fig. R-23B) y la disposición asimétrica de estas proteínas a ambos lados del cuerpo de Flemming (Fig. R-23C), resultó ser similar a lo observado para la proteína normal. La expresión de estas proteínas mutantes, sin embargo, fue incapaz de rescatar el fenotipo causado por la bajada en los niveles de CHMP4C endógeno mediante transfección de si4C, dando lugar a un porcentaje de células con remanente similar al observado en las células parentales con CHMP4C silenciado (Fig. R-22C).

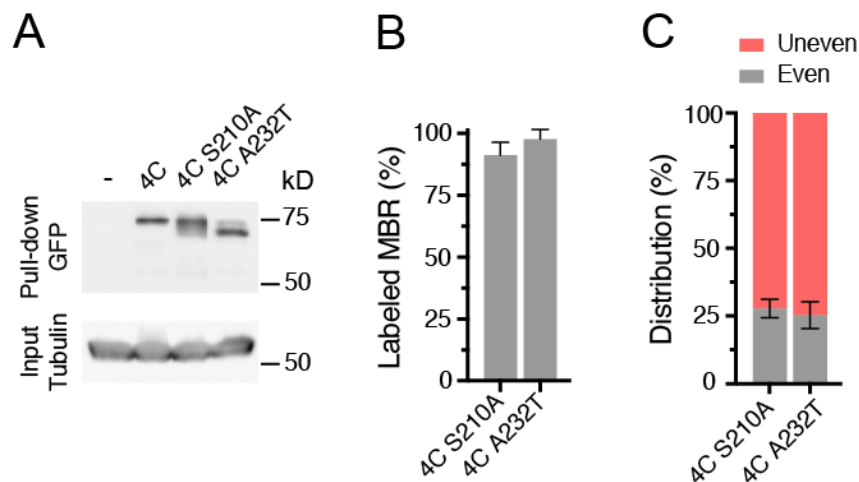


Figura R-23. Las mutaciones que reducen la capacidad de CHMP4C de activar el punto de control de abscisión no afectan a la localización de CHMP4C en el remanente del cuerpo medio. (A) Inmunoblot que muestra los niveles relativos de las formas exógenas de CHMP4C en las líneas que expresan de manera estable los diferentes mutantes. Las muestras se obtuvieron en paralelo mediante *pull-down* contra GFP, la señal de tubulina en el lisado total se utilizó como control de carga. (B) Cuantificación de la presencia de proteínas ESCRT en los remanentes, se representa la media \pm SD del porcentaje de remanentes positivos con respecto al total de estructuras ($n > 58$ provenientes de 3 experimentos independientes). (C) Cuantificación del patrón de ESCRT observado en los remanentes, se representa la media \pm SD del porcentaje de remanentes que muestran un patrón homogéneo o desigual con respecto al total de estructuras ($n > 37$ provenientes de 3 experimentos independientes).

La proporción de células que permanecen unidas por el cuerpo medio se considera una medida indirecta del tiempo de abscisión en muestras fijadas. Para determinar la capacidad de las células de activar el punto de control de abscisión bajo las diferentes condiciones estudiadas se cuantificó este parámetro en las mismas imágenes utilizadas para los estudios de herencia del remanente. El incremento en la velocidad del proceso de abscisión como consecuencia del silenciamiento del gen CHMP4C se tradujo en una disminución del número de células que permanecen unidas por el cuerpo medio. Al igual que ocurre con la herencia de esta estructura, únicamente la forma control de GFP-CHMP4C, capaz de activar el punto de control de abscisión, restauró los valores normales (Fig. R-24).

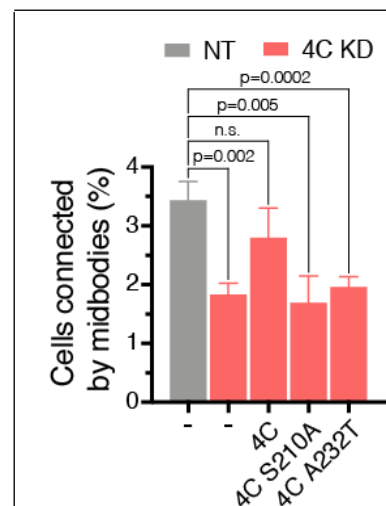


Figura R-24. La medida indirecta del tiempo de abscisión sigue la misma tendencia que la herencia del remanente. Porcentaje de células unidas mediante el cuerpo medio en cada condición indicada. Se representa la media del porcentaje con respecto al total de células obtenida en tres experimentos independientes ($n > 800$). Las cifras presentes en el gráfico indican el p -valor calculado comparando los grupos indicados mediante la prueba t de Student.

Con este nuevo conjunto de resultados, podemos concluir que CHMP4C asegura la herencia del remanente mediante el mantenimiento de la integridad de su conexión con la membrana plasmática. Además, esta función de CHMP4C depende de su capacidad de activar el punto de control de abscisión.

12.- La proteína CHMP4C es necesaria para la formación del cilio primario en células MDCK

En células MDCK, el ensamblaje del cilio primario se lleva a cabo mediante la denominada ruta alternativa de ciliogénesis (Bernabe-Rubio et al., 2016). Durante este proceso, el remanente del cuerpo medio heredado tras la división viaja a lo largo de la membrana apical de la célula hasta reunirse con el centrosoma. El encuentro de estas estructuras promueve el ensamblaje del cilio primario mediante la transferencia de lípidos por parte del remanente hacia el centrosoma (Bernabé-Rubio et al., 2019). Estos lípidos, que forman parte de una región de membrana condensada y presentan una movilidad lateral reducida, pasan a formar parte del cilio primario durante la elongación de la membrana ciliar.

Dado que la herencia del remanente del cuerpo medio es necesaria para la ciliogénesis primaria en células MDCK, decidimos investigar el papel de CHMP4C en este proceso. Para permitir que las células alcanzaran el nivel de polarización requerido para la ciliogénesis, llevamos a cabo el silenciamiento del gen CHMP4C mediante la expresión de shRNA (sh4C). Con el objetivo de identificar las células silenciadas se incluyó un gen reportero GFP bajo control de un promotor independiente en el plásmido utilizado para la expresión del sh4C (ver sección de métodos). La tasa de ciliogénesis de las células positivas para GFP se relativizó a la del resto de células no transfectadas presentes en las mismas imágenes para neutralizar el posible efecto de la variación en el nivel de confluencia entre muestras. Para detección del cilio primario se utilizó un anticuerpo específico contra tubulina acetilada, modificación post-traduccional muy abundante en los microtúbulos del axonema. De acuerdo con nuestras predicciones, el silenciamiento de CHMP4C produjo un descenso drástico en la tasa de ciliogénesis en comparación a la expresión de un plásmido control (Fig. R-25B,C). Este resultado indica que la expresión de CHMP4C es necesaria para que tenga lugar la formación del cilio primario y que este proceso utiliza un remanente conectado con el resto de la membrana plasmática. Además, este experimento sirve de prueba genética que conecta la herencia del remanente del cuerpo medio y la biogénesis ciliar en las células epiteliales MDCK.

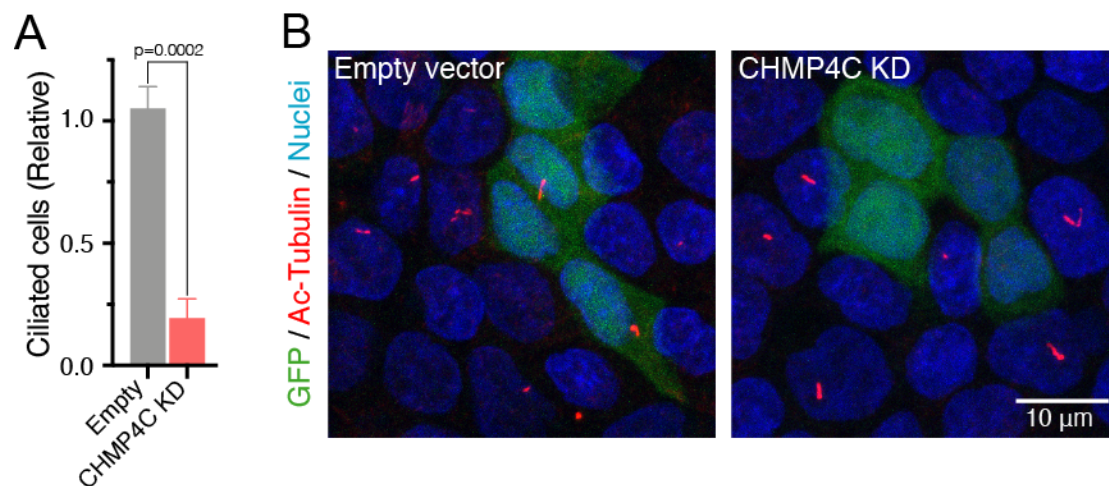


Figura R-25. La proteína CHMP4C es necesaria para la formación del cilio primario en células MDCK. (A) El silenciamiento del gen CHMP4C mediante el uso de un shRNA específico afecta a la tasa de ciliogénesis en células MDCK. Se representa la media de la tasa relativa de ciliogénesis obtenida mediante la comparación de las células GFP positivas y negativas del cultivo ($n > 70$ de tres experimentos independientes). (B) Campos representativos que ilustran las diferencias observadas entre las células que expresan sh4C y las que expresan un plásmido control. En A se indica el p-valor obtenido tras la comparación de los grupos indicados mediante la prueba *t* de Student.

DISCUSIÓN

El cuerpo medio, considerado durante años una estructura vestigial, ha sido señalado durante la última década como un centro de señalización determinante para el destino celular. Al final de la citocinesis, el cuerpo medio sirve de plataforma de reclutamiento para la maquinaria responsable de la separación física de las células hijas. Una vez concluido el proceso de división, la región central de esta estructura puede ser heredada por una de ellas en forma de remanente. La herencia del remanente del cuerpo medio rompe la simetría de la división celular; una de las células hijas, genéticamente idénticas, hereda una estructura compuesta por cientos de proteínas. En los últimos años, a su papel clave como regulador del proceso de abscisión se han ido sumando multitud de funciones post-mitóticas para el remanente del cuerpo medio.

Las diferencias observadas en cuanto al número, posición y estabilidad de los remanentes del cuerpo medio en distintos tipos celulares sugieren la existencia de mecanismos de regulación del proceso de herencia. A pesar de que cada vez son más numerosas las funciones atribuidas a esta estructura, esta posibilidad a penas ha sido explorada. Dada la creciente relevancia del remanente del cuerpo medio, nos propusimos analizar la relación de esta estructura con la célula que la hereda, así como los mecanismos detrás de su retención tras el proceso de división. En este trabajo se ha trazado el origen de la herencia del remanente del cuerpo medio hasta un evento de abscisión incompleto, y señalado a la proteína CHMP4C y su capacidad de activar el punto de control de abscisión como reguladores clave del proceso.

1.- El remanente del cuerpo medio permanece conectado a la membrana plasmática en células MDCK

1.1.- El remanente del cuerpo medio, un orgánulo de herencia asimétrica.

Diversos estudios han descrito los posibles destinos para el remanente del cuerpo medio tras la citocinesis. Algunos tipos celulares, como los progenitores neuronales, tienden a liberar estas estructuras al medio extracelular (Marzesco et al., 2005); otros, sin embargo, las endocitan y retienen o degradan una vez en el citoplasma (Kuo et al., 2011; Peterman et al., 2019). El modelo más aceptado asume que el destino del remanente queda determinado por la dinámica del proceso de abscisión. Dos eventos de abscisión simultáneos a ambos lados del cuerpo de Flemming tendrían como resultado la liberación del remanente. Un proceso de abscisión secuencial, por el contrario, mediaría la herencia del remanente por parte de la célula hija situada en el lado del segundo evento de abscisión. Esta propuesta, aunque plagada de incógnitas, es frecuentemente utilizada para explicar las diferencias observadas entre distintos tipos celulares. La mayoría de los estudios, por tanto, se centran en el destino y funciones del remanente del cuerpo medio, obviando el mecanismo que media su herencia y, por consiguiente, la relación -adhesión o conexión física- que mantiene con la membrana plasmática de la célula que lo hereda.

1.2.- El remanente del cuerpo medio se encuentra sobre la membrana apical en células MDCK

En células epiteliales polarizadas, el avance de la constricción primaria que da lugar al surco de división no ocurre a la misma velocidad en la región basal y apical de la célula, sino que su progresión es mucho más lenta en esta última (Fleming et al., 2007; Reinsch y Karsenti, 1994). Como resultado, el cuerpo medio se forma en la región apical, lo que sitúa el proceso de abscisión y la herencia del remanente del cuerpo medio sobre la superficie celular. Mientras que en otros tipos celulares los remanentes son endocitados antes de ser degradados por autofagia o retenidos en el citoplasma, nuestras observaciones mediante inmunofluorescencia en células epiteliales MDCK muestran que la mayoría de los remanentes permanecen intactos sobre la superficie apical. Esta localización permitiría que los remanentes puedan moverse hasta encontrarse con el centrosoma en el centro de la membrana apical, lo que, según estudios previos del laboratorio, permite la formación del cilio primario en este tipo celular (Bernabe-Rubio et al., 2016). Este hecho, unido a la observación por parte de otros grupos de remanentes del cuerpo medio moviéndose sobre la superficie apical durante horas en varios tipos

celulares (Crowell et al., 2014), sugiere la existencia de un mecanismo que medie la herencia y posterior retención de estas estructuras sin necesidad de ser endocitadas.

1.3.- El remanente del cuerpo medio está conectado físicamente con la membrana plasmática

La pérdida de los haces de microtúbulos de uno de los brazos del cuerpo medio, unida a la retracción de la estructura hacia el lado contrario, se consideran indicadores de un primer evento de abscisión satisfactorio en el que tanto los microtúbulos como la membrana son escindidos (Lafaurie-Janvire et al., 2013). Una vez separadas las células hijas, sin embargo, no existe ningún indicador adicional que permita evaluar la integridad de la membrana durante el segundo evento de abscisión. Los brazos del cuerpo medio son normalmente muy cortos y están muy próximos a la superficie de las células hijas, lo que impide la visualización de la membrana mediante microscopía confocal. Para solventar esta limitación hemos desarrollado un protocolo de microscopía correlativa que combina la especificidad de la microscopía confocal con el poder de resolución de un microscopio electrónico de barrido de última generación.

El análisis mediante microscopía correlativa de los remanentes del cuerpo medio en células MDCK indica la existencia de una conexión de naturaleza membranosa entre uno de los extremos del remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática de la célula que lo hereda. La utilización simultánea de ambas técnicas de microscopía nos ha permitido determinar que la conexión observada mediante microscopía electrónica de barrido carece de microtúbulos. Esta observación pone en cuestión la utilización de marcajes contra esta proteína como único criterio a la hora de juzgar la continuidad de estas estructuras con el cuerpo celular (Elia et al., 2011; Goliand et al., 2018). La existencia de la conexión identificada mediante SEM confirma y refuerza trabajos previos del laboratorio llevados a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión, en los que la reconstrucción de secciones ultrafinas no permitió confirmar inequívocamente la existencia de la conexión (Bernabe-Rubio et al., 2016).

La presencia de la conexión no parece consistente con lo descrito por Crowell et al. (2014), que propone la existencia de un receptor específico dependiente de calcio que mediaría la retención por adhesión del remanente del cuerpo medio hasta su endocitosis. Aunque en este trabajo también utilizan microscopía correlativa para el estudio de estas estructuras (Fremont y Echard, 2017), señalan la existencia de la conexión entre el remanente y la membrana plasmática como algo minoritario. Estas discrepancias pueden deberse a la utilización de una línea celular diferente, HeLa en su caso y MDCK

en el nuestro, así como a diferencias importantes en el protocolo de microscopía correlativa seguidos en cada caso. En primer lugar, mientras que en nuestro trabajo se ha utilizado la falta de haces de microtúbulos a los lados del cuerpo de Flemming como criterio de selección de estructuras candidatas, en su lugar utilizan microscopía de contraste de fases. Además, existen diferencias sustanciales en los protocolos de preparación de muestras. En su caso utilizan un protocolo convencional que consiste en un paso de fijación (al 4% de paraformaldehído), dos de post-fijación (al 2,5% de glutaraldehído seguido de 1% de osmio), desecación mediante punto crítico y recubrimiento con dos capas de oro-paladio. Nuestro protocolo de tratamiento de muestras, carente de post-fijación y con desecación mediante HMDS nos ha permitido preservar características morfológicas que, probablemente, no habrían sobrevivido a los numerosos pasos de un protocolo tradicional (Katsen-Globa et al., 2016). La utilización de un microscopio electrónico de barrido de última generación, capaz de generar imágenes mediante la utilización de electrones de baja energía (de un 1 kV en nuestro caso frente a 7 kV en el suyo) nos ha permitido prescindir del recubrimiento metálico, lo que preserva aún más los detalles morfológicos de la muestra (Wuhrer y Moran, 2016). Esta característica nos ha permitido además reducir la acumulación de carga, reducir el daño a la muestra, y alcanzar un nivel de detalle imposible de igualar en equipos incapaces de llevar a cabo VLV-SEM.

Para extender nuestras observaciones a células vivas llevamos a cabo un análisis del movimiento del remanente del cuerpo medio. El patrón observado mediante videomicroscopía es compatible con la existencia de un único punto de anclaje a la membrana plasmática situado en uno de los extremos de la estructura. La presencia de dicha conexión restringe el movimiento del remanente a una pequeña zona de la superficie celular, definiendo un área de confinamiento con unas dimensiones compatibles con las mediciones directas obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.

En resumen, nuestros resultados apoyan de forma clara la existencia de una conexión física entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática en las células MDCK, señalándola como potencial responsable de la retención de estas estructuras tras la división celular. La extensión de estas observaciones a otros tipos celulares requeriría estudios adicionales, ya que no hay suficientes evidencias disponibles con la profundidad necesaria. En cualquier caso, los datos existentes no permiten descartar que la unión del remanente a la superficie de la membrana pueda ser complementada mediante otros mecanismos adicionales.

1.4.- Los remanentes del cuerpo medio presentan rasgos morfológicos comunes

El elevado número de estructuras analizadas mediante microscopía correlativa nos ha permitido llevar a cabo una amplia caracterización morfológica del remanente del cuerpo medio. Estas estructuras son claramente distinguibles sobre la membrana plasmática, y poseen una forma característica que se asemeja a un disco engrosado flanqueado por dos estructuras cónicas. Diversos estudios han descrito la presencia de características morfológicas propias del cuerpo medio una vez esta estructura ha sido heredada en forma de remanente (Mullins y Bieseke, 1977). Esto, unido a nuestras observaciones mediante CLEM, nos permite asumir que la zona central engrosada de los remanentes es en realidad el cuerpo de Flemming. Las estructuras cónicas que lo flanquean, serían por tanto los dos extremos generados por sendos eventos de abscisión a partir de los brazos del cuerpo medio que originalmente mantenían unidas las células hijas.

Medidas directas realizadas sobre las imágenes de microscopía electrónica de barrido ponen de manifiesto una gran homogeneidad en la anchura del cuerpo de Flemming. Aunque los valores exactos difieren de un tipo celular a otro, esta observación concuerda con lo previamente descrito en la literatura (Crowell et al., 2014), y pone de manifiesto el alto grado de organización de la región central del cuerpo medio. La longitud total de los remanentes, por el contrario, presenta una enorme variabilidad causada principalmente por las diferencias de tamaño existentes entre ambos extremos de la estructura. Mientras que el lado del remanente del cual aflora la conexión con la membrana plasmática presenta una forma cónica definida, el otro extremo de la estructura suele ser más corto y redondeado.

Por lo tanto, en combinación con los estudios previos que analizan la morfología del remanente del cuerpo medio, nuestros resultados ponen de manifiesto la presencia de rasgos morfológicos comunes en estas estructuras. Dada su localización a uno de los lados del cuerpo de Flemming, el punto de origen de la conexión coincidiría con el sitio de uno de los eventos de abscisión. Esta observación situaría el origen de la conexión en el proceso de citocinesis, lo que señala a un segundo evento de abscisión incompleto como posible responsable de la herencia del remanente del cuerpo medio.

2.- La conexión remanente-membrana plasmática tiene su origen en el proceso de abscisión

2.1.- La maquinaria ESCRT sigue la misma dinámica durante ambos eventos de abscisión

Desde el descubrimiento de la constricción secundaria, que produce un estrechamiento en el cuerpo medio y termina por separar las células hijas (Mullins y Bieseke, 1977), se han propuesto distintos mecanismos para explicar el proceso de abscisión. Aunque la contribución de los filamentos de actina y el tráfico vesicular se ha demostrado crucial para la maduración del cuerpo medio, la tarea de escindir la membrana de esta estructura recae sobre la maquinaria ESCRT (Mierzwa y Gerlich, 2014).

La observación mediante microscopía electrónica de transmisión y tomografía electrónica de filamentos de 17 nm de diámetro en torno a la zona de constricción dio inicio a la investigación sobre la composición molecular de estos polímeros (Guizetti et al., 2011). Aunque la identidad de estos filamentos aún no puede ser inequívocamente atribuida, al menos no en solitario, a polímeros de ESCRT, su formación depende de estas proteínas. Los últimos modelos proponen la existencia de polímeros helicoidales de ESCRT originados en la cercanía del cuerpo de Flemming. La extensión de estos polímeros hacia el sitio de abscisión, unida a una disminución paulatina de su diámetro, mediaría la aparición de la constricción secundaria, la eliminación de los microtúbulos y el paso final de fusión de membranas (Goliand et al., 2018).

El análisis de la distribución de miembros del complejo ESCRT-III durante el proceso de abscisión en células MDCK arroja resultados compatibles con este modelo. Dado nuestro interés en el segundo evento de abscisión, hemos llevado este análisis más allá del fin de la citocinesis. Nuestros resultados revelan que, tras la separación *de facto* de las dos células hijas con el primer evento de abscisión, la misma secuencia de eventos, salvando la escisión de membranas, tiene lugar al otro lado del cuerpo de Flemming. A la formación de un filamento helicoidal de ESCRT-III hacia el segundo sitio de abscisión le acompaña la aparente degeneración del polímero responsable del primer evento, dando lugar a un patrón anular o puntual en el extremo ya escindido.

2.2.- Una fracción de los polímeros de ESCRT presentes en los remanentes del cuerpo medio coincide con la conexión con la membrana plasmática.

Los escasos estudios en los que se ha analizado la dinámica de ESCRT más allá de la citocinesis han demostrado la existencia de mecanismos de coordinación entre los eventos de escisión a ambos lados del cuerpo de Flemming. El cuerpo medio está sujeto a una gran tensión mecánica, que es liberada con el primer evento de abscisión. Se cree que la liberación de esta tensión desencadena la polimerización del complejo ESCRT en el lado opuesto (Lafaurie-Janvore et al., 2013). Estos estudios, sin embargo, utilizan la pérdida de los haces de microtúbulos entre el cuerpo de Flemming y el resto de la célula como único criterio a la hora de determinar la continuidad entre ambas estructuras. Nuestros resultados cuestionan la validez de este criterio, ya que hemos observado la existencia de una conexión membranosa en remanentes que carecen de conexión microtubular con el cuerpo celular. Por ello, investigamos con más detalle la relación entre la maquinaria ESCRT y la conexión.

Nuestro estudio mediante microscopía confocal indica que todas las proteínas de la maquinaria ESCRT analizadas, ya sea mediante expresión exógena o mediante inmunofluorescencia, están presentes en los remanentes del cuerpo medio en células MDCK. La distribución de estos marcadores, sin embargo, es diferente a ambos lados del cuerpo de Flemming, dando lugar a un patrón desigual en la mayoría de los casos. Mientras que a un lado del remanente se observa una distribución anular o puntual, al otro se observan estructuras cónicas o una subpoblación de ESCRT distal de la población central. Según los modelos más recientes, estos patrones corresponden a las fases previas al proceso de escisión de membranas, en los que el polímero de ESCRT es remodelado tras alcanzar el punto de máxima constricción dando lugar a dos poblaciones separadas (Goliand et al., 2018). Teniendo en cuenta estos modelos, nuestras observaciones sugieren que el polímero responsable del primer evento de abscisión desaparece rápidamente tras haber cumplido su función, mientras que el responsable del segundo evento permanece intacto tras la eliminación de los microtúbulos.

La retracción del cuerpo medio debida a la liberación de tensión mecánica permite detectar la escisión de membranas tras el primer evento de abscisión. Dado que no existe una señal equivalente en el caso del segundo evento, nos servimos de nuevo del análisis mediante CLEM para determinar la integridad de la membrana y su relación con el marcaje desigual de ESCRT. Nuestros resultados indicaron que, tanto para la subunidad estructural CHMP4B como para la reguladora CHMP4C, la presencia de una conexión membranosa observable mediante microscopía electrónica de barrido coincide

con la localización de patrones de ESCRT relacionados con las últimas fases del proceso de abscisión en el mismo lado del remanente. Esta observación se ve reforzada por el análisis conjunto de la localización de estas proteínas y el movimiento confinado de los remanentes en células vivas. Mediante esta aproximación hemos confirmado de manera independiente la presencia de una subpoblación de ESCRT en la región inmóvil que señala el origen de la conexión entre el remanente del cuerpo medio y la superficie de la membrana.

El hallazgo de polímeros estables de ESCRT en el lado del remanente conectado a la membrana, unida a la aparente degeneración del polímero responsable del primer evento de abscisión, podrían explicar algunos de los rasgos morfológicos observados mediante CLEM. Así, el aspecto cónico del extremo del remanente continuo con la membrana se debería a la presencia de un polímero helicoidal de ESCRT en esta localización. La degeneración del polímero al otro lado del cuerpo de Flemming, por su parte, explicaría la pérdida de esta característica morfológica, dando lugar a un extremo más achatado.

Considerados en su conjunto, estos resultados sugieren que no se produce escisión de membranas durante el segundo evento de abscisión. El polímero de ESCRT responsable de este evento, al contrario de lo que ocurre al otro lado del cuerpo de Flemming, permanece intacto tras la eliminación de los microtúbulos. La estabilidad de esta estructura contrasta con el comportamiento típico de la maquinaria ESCRT, que requiere de un gran dinamismo para llevar a cabo el remodelado de membranas biológicas (Mierzwa et al., 2017). Esta observación ofrece una posible explicación a la ausencia de escisión de membranas en el segundo sitio de abscisión; la aparente “congelación” del complejo ESCRT tendría como consecuencia el mantenimiento de continuidad entre la membrana plasmática y el remanente del cuerpo medio, haciendo posible que éste sea heredado físicamente unido a la membrana de una de las células hijas.

2.3.- El remanente del cuerpo medio se comporta como un compartimento celular independiente.

La conexión física entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática podría servir de vía de comunicación entre el interior de esta estructura y el citosol. Nuestros ensayos de FRAP, sin embargo, indicaron que la continuidad de membranas observada mediante SEM no va acompañada de la libre difusión de proteínas solubles entre ambas estructuras. Así, mientras que la proteína fluorescente

monomérica mScarlet es capaz de difundir entre las dos células hijas cuando éstas permanecen todavía unidas por el cuerpo medio, es incapaz de atravesar la conexión remanente-membrana. Este resultado sugiere que, a pesar de estar conectadas físicamente, existe una barrera de difusión que impide el intercambio de material soluble entre el remanente y el cuerpo celular.

Estudios recientes en células HeLa han demostrado que la función del complejo ESCRT durante la citocinesis requiere de un recambio activo de subunidades mediado por la AAA-ATPasa VPS4 (Maity et al., 2019; Mierzwa et al., 2017). Nuestros ensayos de FRAP durante las fases previas a la abscisión confirman esta observación para las proteínas CHMP4B y CHMP4C también en células MDCK. El análisis de remanentes del cuerpo medio con un patrón de movimiento confinado señala, sin embargo, una ausencia de recambio activo de subunidades de forma similar a lo observado para la proteína mScarlet. Este resultado, aunque compatible con la presencia de una barrera de difusión, podría deberse también a que los polímeros de ESCRT asociados a la conexión sean de naturaleza estable.

La existencia de polímeros estables de ESCRT ha sido descrita en el sistema nervioso central, donde se cree que contribuyen a la regulación de la función post-sináptica (Sadoul et al., 2018). En las sinapsis excitatorias, la región post-sináptica forma frecuentemente una estructura especializada en forma de hongo denominada espina dendrítica (Arellano et al., 2007; Sala y Segal, 2014). Cambios en la forma y volumen de estas estructuras regulan la actividad sináptica y son necesarios para la plasticidad del sistema nervioso. Las subunidades CHMP2B y CHMP4B del complejo ESCRT-III contribuyen al mantenimiento de la morfología de las espinas dendríticas. Aunque su función exacta aún está por determinar, estas proteínas se concentran en torno a la densidad post-sináptica, una región electrondensa rica en receptores, y en el “cuello” de estas estructuras (Chassefeyre et al., 2015) (Fig. D-1). La capacidad de CHMP2B de formar barreras de difusión *in vitro* (De Franceschi et al., 2018), unida a su localización en torno a la densidad post-sináptica sugiere un papel para estos polímeros estables en el mantenimiento de este nanodominio de membrana. En el caso de la maquinaria ESCRT presente en la conexión entre la espina y la dendrita, se ha propuesto un posible papel estructural en el mantenimiento y regulación de la forma de las espinas (Chassefeyre et al., 2015).

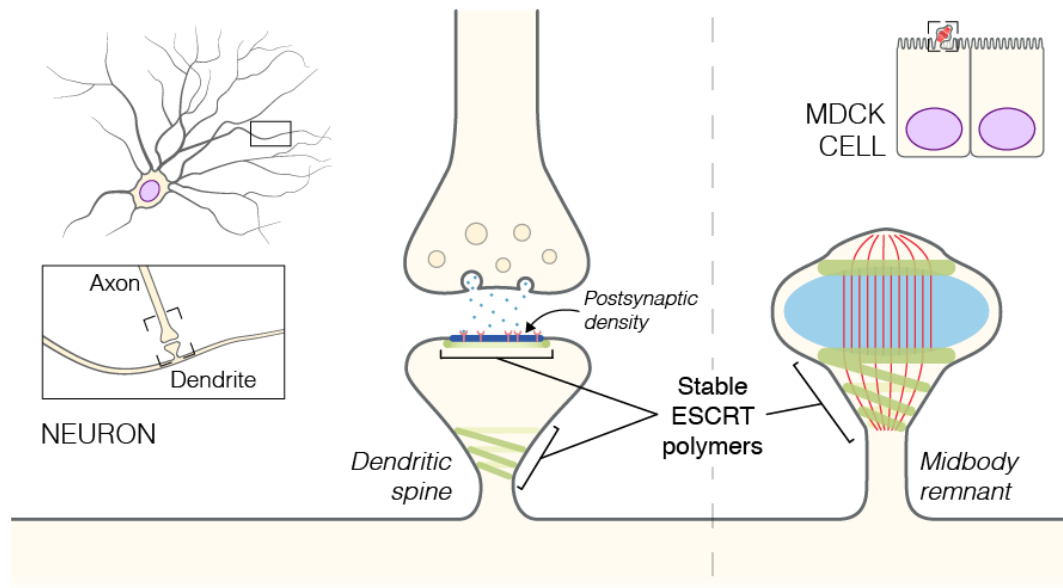


Figura D-1. Similitudes entre las espinas dendríticas y los remanentes del cuerpo medio. A pesar de sus diferencias en cuanto a origen y función, ambas estructuras presentan similitudes morfológicas. La presencia de polímeros estables de ESCRT en ambas estructuras sugiere que podrían desempeñar un papel similar.

Las similitudes existentes entre las espinas dendríticas y remanentes del cuerpo medio, ambas estructuras bulbosas conectadas al cuerpo celular mediante un fino túbulo membranoso, sugieren un papel común para los polímeros estables de ESCRT asociados a ambas estructuras (Fig. D-1). Aunque nuestros experimentos de FRAP no nos han permitido determinar su existencia, un intercambio regulado de sustancias entre el remanente del cuerpo medio y el citoplasma, tal y como ocurre en las espinas dendríticas, podría mediar las funciones de esta estructura tras su herencia.

3.- La proteína CHMP4C del complejo ESCRT regula la integridad de la conexión remanente-membrana plasmática.

3.1.- La proteína CHMP4C es necesaria para la herencia del remanente del cuerpo medio

La posible relación entre la actividad de la maquinaria ESCRT y la herencia del remanente del cuerpo medio situaría a este proceso bajo el control de los mismos mecanismos de regulación que rigen el proceso de abscisión. Entre ellos, el punto de control de abscisión destaca por tener lugar en el seno del cuerpo medio, lo que le permitiría seguir actuando una vez la estructura ha sido heredada en forma de remanente. Diversos estudios han puesto de manifiesto el papel central de la subunidad CHMP4C del complejo ESCRT-III en la ruta del punto de control de abscisión, donde

sirve de puente entre las quinasas mitóticas y la maquinaria ESCRT (Capalbo et al., 2012; Carlton et al., 2012; Sadler et al., 2018). En respuesta a varios estímulos, como excesiva tensión mecánica en el cuerpo medio, la presencia de ADN en el mismo o problemas en la reformación de los complejos del poro nuclear, la activación de esta ruta detiene el proceso de abscisión. En estos trabajos se observó que la reducción de los niveles de CHMP4C resulta en una disminución del tiempo de abscisión como consecuencia de la disregulación de la maquinaria ESCRT. Nuestros resultados, obtenidos tanto por medida directa mediante videomicroscopía como indirectamente por el número de células conectadas por el cuerpo medio en un momento dado, confirman la existencia de este mecanismo en células MDCK.

En lo que respecta al segundo evento de abscisión, la disminución en los niveles de expresión de la proteína CHMP4C afectó negativamente a la capacidad de las células MDCK de retener el remanente del cuerpo medio tras la división. La expresión exógena de CHMP4C restauró tanto la herencia del remanente como la velocidad de abscisión a valores normales, lo que confirma la relación entre la regulación de la maquinaria ESCRT y la herencia del remanente del cuerpo medio. Este resultado, junto con la detección de polímeros de ESCRT-III que contienen la subunidad CHMP4C en la conexión remanente-membrana plasmática, señala a esta proteína como posible responsable de la inhibición del segundo evento de abscisión en células MDCK; lo que mediaría el mantenimiento de la conexión remanente-membrana y la retención de esta estructura tras la división.

3.2.- La capacidad de activar el punto de control de abscisión es crucial para el papel de CHMP4C como regulador del proceso de herencia del remanente

Aunque el mecanismo exacto mediante el cual el punto de control de abscisión inhibe la actividad de la maquinaria ESCRT es desconocido, varios estudios han identificado actores clave en el proceso. En lo que respecta a CHMP4C, la fosforilación mediada por Aurora B (Capalbo et al., 2012; Carlton et al., 2012) y su capacidad de interactuar con el factor de reclutamiento ALIX (Sadler et al., 2018) han sido identificados como necesarios para la activación correcta del punto de control de abscisión.

Mediante el uso de mutantes puntuales de CHMP4C, hemos determinado que su capacidad de activar el punto de control de abscisión es necesaria para asegurar la correcta herencia del remanente del cuerpo medio. Así, mientras que la expresión de CHMP4C intacta revirtió el fenotipo causado por la reducción de los niveles de CHMP4C endógeno, la expresión de dos mutantes de la proteína incapaces de activar el

punto de control de abscisión no restauró el fenotipo normal. El desconocimiento actual del mecanismo exacto de la ruta nos impide, sin embargo, determinar si el punto de control de abscisión como un todo, o únicamente algunos de sus componentes, como CHMP4C, son necesarios para asegurar la correcta herencia del remanente del cuerpo medio tras la división.

3.3.- Los defectos en la herencia del remanente del cuerpo medio afectan al proceso de ciliogénesis primaria en las células MDCK

Trabajos previos del laboratorio han descrito la participación del remanente del cuerpo medio en el proceso de ciliogénesis mediante la ruta alternativa en células MDCK (Bernabe-Rubio et al., 2016; Bernabé-Rubio et al., 2019). Según el modelo propuesto, la reunión de esta estructura con el centrosoma en la membrana apical es necesaria para el correcto ensamblaje del cilio primario en esta línea celular. En el presente trabajo se ha utilizado este proceso para estudiar las posibles consecuencias funcionales de la falta de regulación de la herencia del remanente del cuerpo medio. De forma consistente con el papel propuesto para esta estructura, observamos que la formación de cilios primarios disminuía de manera drástica como consecuencia de la desregulación de la maquinaria ESCRT en el segundo sitio de abscisión producida por la bajada en los niveles de la proteína CHMP4C. Este resultado refuerza el papel del remanente del cuerpo medio y sirve de prueba genética que relaciona la herencia de esta estructura y la formación del cilio primario.

4.- Consideraciones finales

Los resultados obtenidos durante este trabajo relacionan las actividades atribuidas al cuerpo medio durante la citocinesis, su posterior herencia en forma de remanente y el creciente grupo de funciones post-mitóticas de esta estructura. Mediante la combinación de técnicas de imagen hemos determinado que la maquinaria ESCRT y sus mecanismos de regulación, responsables de la correcta separación de las células hijas, intervienen además en la herencia del remanente del cuerpo medio tras la división celular.

Según nuestro modelo (Fig. D-2), la retención del remanente del cuerpo medio sobre la superficie apical en células MDCK se debe a la presencia de una conexión membranosa entre ambas estructuras. El origen de esta conexión se remonta a etapas posteriores al fin de la citocinesis, donde un segundo evento de abscisión incompleto, en el que los microtúbulos son eliminados pero la membrana no es escindida, media la

retención del remanente tras la división. La subunidad CHMP4C del complejo ESCRT-III, gracias a su capacidad de activar el punto de control de abscisión, modula la actividad del complejo ESCRT en el segundo sitio de abscisión, asegurando así la integridad de la conexión remanente-membrana y la herencia de esta estructura.

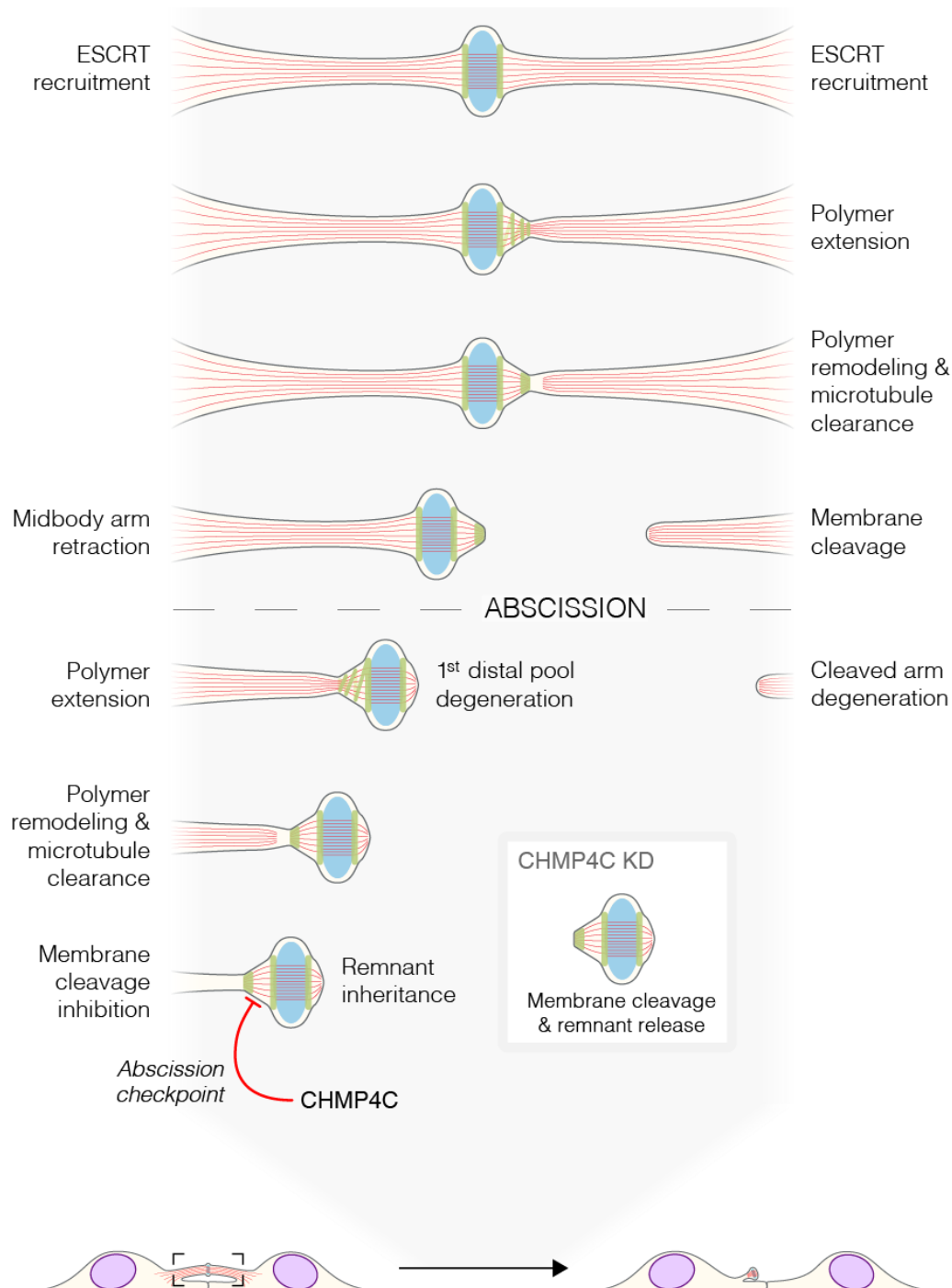


Figura D-2. Modelo del mecanismo de herencia del remanente del cuerpo medio en células epiteliales MDCK. Un segundo evento de abscisión incompleto durante la citocinesis tiene como consecuencia el mantenimiento de una conexión membranosa entre el remanente del cuerpo medio y la célula que lo hereda. La integridad de esta conexión depende de la regulación de la maquinaria ESCRT mediada por la subunidad CHMP4C gracias a su capacidad de activar el punto de control de abscisión.

A pesar de los avances obtenidos en el estudio de la relación entre el remanente del cuerpo medio y la membrana plasmática, así como algunos componentes del mecanismo molecular subyacente, existen todavía muchas incógnitas en torno a este proceso. En primer lugar, y pese a reclutar la misma maquinaria, los eventos de abscisión a ambos lados del cuerpo de Flemming tienen desenlaces muy diferentes. A parte de la participación de alguna proteína no incluida en nuestro análisis, esta asimetría podría deberse a un factor intrínseco al proceso como es la liberación de tensión mecánica tras el primer evento de abscisión. La capacidad de los polímeros de ESCRT de responder a este tipo de fuerzas se ha propuesto en el pasado (Lafaurie-Janvore et al., 2013), y podría explicar por sí misma las diferencias observadas entre ambos eventos de abscisión.

Otro aspecto todavía por desvelar es cómo el remanente del cuerpo medio constituye un compartimento especializado, rasgo que comparte con las espinas dendríticas y el propio cilio primario, y qué mecanismos regulan el intercambio de sustancias con el cuerpo celular, si es que éste se produce. Tanto proteínas del complejo ESCRT como de la familia de las septinas, todas susceptibles de formar barreras de difusión, han sido detectadas en las tres estructuras (Caudron y Barral, 2009; Diener et al., 2015). La caracterización de la barrera presente en el remanente del cuerpo medio permitiría ahondar en la función de esta estructura y las implicaciones de su herencia tras la división celular.

Las técnicas y estrategias desarrolladas durante el presente trabajo son susceptibles de aplicarse a otros tipos celulares y procesos mediados por el remanente del cuerpo medio, contribuyendo de esta forma al descubrimiento de nuevas funciones de esta estructura aún tan desconocida.

CONCLUSIONES

1.- Los remanentes del cuerpo medio se encuentran en la superficie apical de las células MDCK, a la que se permanecen unidos mediante una conexión membranosa.

2.- Aunque de morfología variada, los remanentes del cuerpo medio comparten una serie de características generales, como su tamaño, estructura externa y, en la mayoría de los casos, la presencia de una conexión membranosa que conecta uno de sus extremos con la membrana plasmática

3.- Durante el segundo evento de abscisión, las proteínas del complejo ESCRT siguen la misma dinámica observada durante el primer evento.

4.- Una vez heredado, el remanente del cuerpo medio retiene proteínas del complejo ESCRT. Su distribución a lo largo de la estructura no es homogénea, existiendo un polímero de ESCRT en la conexión que une los remanentes a la membrana plasmática.

5.- El remanente del cuerpo medio parece constituir un compartimento celular independiente, a juzgar por la ausencia de intercambio de proteínas solubles o subunidades del complejo ESCRT entre esta estructura y el cuerpo celular.

6.- La reducción de los niveles de expresión de la proteína CHMP4C disminuye la capacidad de las células MDCK de retener el remanente del cuerpo medio tras la división. La capacidad de esta proteína de activar el punto de control de abscisión es necesaria para el proceso.

7.- La pérdida de los remanentes del cuerpo medio reduce la formación del cilio primario en células MDCK.

En resumen, la proteína CHMP4C parece mediar la herencia del remanente del cuerpo medio manteniéndolo unido a la membrana plasmática mediante una conexión membranosa, requisito para la correcta formación del cilio primario.

- 1.- Midbody remnants can be found on the apical surface of MDCK cells, where they are connected to the plasma membrane by a thin membranous stalk.
- 2.- Despite their variable morphology, midbody remnants share some prevalent features including size, overall structure and, in most cases, the presence of a membranous tether that connects one of their ends to the plasma membrane.
- 3.- During the second abscission event, ESCRT proteins exhibit the same dynamics as those observed during the first event.
- 4.- Once inherited, the remnants retain ESCRT components. The distribution of these proteins along the remnants is not homogeneous, whereby an ESCRT polymer is present at the connection between the remnant and the plasma membrane.
- 5.- According to the lack of exchange of soluble proteins and ESCRT components with the cell body, midbody remnants seem to constitute an independent cellular compartment.
- 6.- CHMP4C depletion reduces midbody remnant retention after cell division in MDCK cells. The capacity of CHMP4C to engage the abscission checkpoint is necessary for this process.
- 7.- Midbody remnant loss impairs primary cilium formation in MDCK cells.

In short, CHMP4C seems to mediate midbody remnant inheritance by maintaining the binding of the remnant to the plasma membrane through a membranous tether, which is a requisite for primary cilium formation.

BIBLIOGRAFÍA

- AGROMAYOR, M. & MARTIN-SERRANO, J. 2013. Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission. *Trends Cell Biol*, 23, 433-441.
- ARAI, Y., SAMPAIO, J. L., WILSCH-BRAUNINGER, M., ETTINGER, A. W., HAFFNER, C. & HUTTNER, W. B. 2015. Lipidome of midbody released from neural stem and progenitor cells during mammalian cortical neurogenesis. *Front Cell Neurosci*, 9, 325.
- ARELLANO, J. I., BENAVIDES-PICCIONE, R., DEFELIPE, J. & YUSTE, R. 2007. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci*, 1, 131-143.
- ARII, J., WATANABE, M., MAEDA, F., TOKAI-NISHIZUMI, N., CHIHARA, T., MIURA, M., MARUZURU, Y., KOYANAGI, N., KATO, A. & KAWAGUCHI, Y. 2018. ESCRT-III mediates budding across the inner nuclear membrane and regulates its integrity. *Nat Commun*, 9, 3379.
- BAJOREK, M., MORITA, E., SKALICKY, J. J., MORHAM, S. G., BABST, M. & SUNDQUIST, W. I. 2009. Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 20, 1360-1373.
- BASANT, A. & GLOTZER, M. 2018. Spatiotemporal Regulation of RhoA during Cytokinesis. *Curr Biol*, 28, R570-R580.
- BERNABE-RUBIO, M. & ALONSO, M. A. 2017. Routes and machinery of primary cilium biogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 74, 4077-4095.
- BERNABE-RUBIO, M., ANDRES, G., CASARES-ARIAS, J., FERNANDEZ-BARRERA, J., RANGEL, L., REGLERO-REAL, N., GERSHLICK, D. C., FERNANDEZ, J. J., MILLAN, J., CORREAS, I., MIGUEZ, D. G. & ALONSO, M. A. 2016. Novel role for the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, 214, 259-273.
- BERNABÉ-RUBIO, M., BOSCH-FORTEA, M., GARCÍA, E., DE LA SERNA, J. B. & ALONSO, M. A. 2019. The ciliary membrane of polarized epithelial cells stems from a midbody remnant-associated membrane patch with condensed nanodomains. *bioRxiv*, 667642.
- BRILL, J. A., WONG, R. & WILDE, A. 2011. Phosphoinositide function in cytokinesis. *Curr Biol*, 21, 930-934.
- BUCK, R. C. & TISDALE, J. M. 1962. The fine structure of the mid-body of the rat erythroblast. *J Cell Biol*, 13, 109-115.
- BYERS, B. & ABRAMSON, D. H. 1968. Cytokinesis in HeLa: post-telophase delay and microtubule-associated motility. *Protoplasma*, 66, 413-435.
- CABALLE, A., WENZEL, D. M., AGROMAYOR, M., ALAM, S. L., SKALICKY, J. J., KLOC, M., CARLTON, J. G., LABRADOR, L., SUNDQUIST, W. I. & MARTIN-SERRANO, J. 2015. ULK3 regulates cytokinetic abscission by phosphorylating ESCRT-III proteins. *Elife*, 4, e06547.
- CAPALBO, L., MONTEBAULT, E., TAKEDA, T., BASSI, Z. I., GLOVER, D. M. & D'AVINO, P. P. 2012. The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biol*, 2, 120070.

- CARLTON, J. G., CABALLE, A., AGROMAYOR, M., KLOC, M. & MARTIN-SERRANO, J. 2012. ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science*, 336, 220-225.
- CAUDRON, F. & BARRAL, Y. 2009. Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev Cell*, 16, 493-506.
- CHAI, Y., TIAN, D., YANG, Y., FENG, G., CHENG, Z., LI, W. & OU, G. 2012. Apoptotic regulators promote cytokinetic midbody degradation in *C. elegans*. *J Cell Biol*, 199, 1047-1055.
- CHASSEFEYRE, R., MARTINEZ-HERNANDEZ, J., BERTASO, F., BOUQUIER, N., BLOT, B., LAPORTE, M., FRABOULET, S., COUTE, Y., DEVOY, A., ISAACS, A. M., PERNET-GALLAY, K., SADOUL, R., FAGNI, L. & GOLDBERG, Y. 2015. Regulation of postsynaptic function by the dementia-related ESCRT-III subunit CHMP2B. *J Neurosci*, 35, 3155-3173.
- CHEN, C. T., ETTINGER, A. W., HUTTNER, W. B. & DOXSEY, S. J. 2013. Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies. *Trends Cell Biol*, 23, 118-128.
- CHIARUTTINI, N., REDONDO-MORATA, L., COLOM, A., HUMBERT, F., LENZ, M., SCHEURING, S. & ROUX, A. 2015. Relaxation of loaded ESCRT-III spiral springs drives membrane deformation. *Cell*, 163, 866-879.
- CHIARUTTINI, N. & ROUX, A. 2017. Dynamic and elastic shape transitions in curved ESCRT-III filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 47, 126-135.
- CHRIST, L., WENZEL, E. M., LIESTOL, K., RAIBORG, C., CAMPSTEIJN, C. & STENMARK, H. 2016. ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission. *J Cell Biol*, 212, 499-513.
- CONNELL, J. W., LINDON, C., LUZIO, J. P. & REID, E. 2009. Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic*, 10, 42-56.
- CROWELL, E. F., GAFFURI, A. L., GAYRAUD-MOREL, B., TAJBAKHSH, S. & ECHARD, A. 2014. Engulfment of the midbody remnant after cytokinesis in mammalian cells. *J Cell Sci*, 127, 3840-3851.
- CROWELL, E. F., TINEVEZ, J. Y. & ECHARD, A. 2013. A simple model for the fate of the cytokinesis midbody remnant: implications for remnant degradation by autophagy. *Bioessays*, 35, 472-481.
- D'AVINO, P. P. & CAPALBO, L. 2015. New auroras on the roles of the chromosomal passenger complex in cytokinesis: implications for cancer therapies. *Front Oncol*, 5, 221.
- DAMBOURNET, D., MACHICOANE, M., CHESNEAU, L., SACHSE, M., ROCANCOURT, M., EL MARJOU, A., FORMSTECHE, E., SALOMON, R., GOUD, B. & ECHARD, A. 2011. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 13, 981-988.
- DE FRANCESCHI, N., ALQABANDI, M., MIGUET, N., CAILLAT, C., MANGENOT, S., WEISSENHORN, W. & BASSEREAU, P. 2018. The ESCRT protein CHMP2B acts as a diffusion barrier on reconstituted membrane necks. *J Cell Sci*, 132.

- DEMA, A., MACALUSO, F., SGRO, F., BERTO, G. E., BIANCHI, F. T., CHIOTTO, A. A., PALLAVICINI, G., DI CUNTO, F. & GAI, M. 2018. Citron kinase-dependent F-actin maintenance at midbody secondary ingression sites mediates abscission. *J Cell Sci*, 131.
- DIENER, D. R., LUPETTI, P. & ROSENBAUM, J. L. 2015. Proteomic analysis of isolated ciliary transition zones reveals the presence of ESCRT proteins. *Curr Biol*, 25, 379-384.
- DIONNE, L. K., WANG, X. J. & PREKERIS, R. 2015. Midbody: from cellular junk to regulator of cell polarity and cell fate. *Curr Opin Cell Biol*, 35, 51-58.
- ELIA, N., FABRIKANT, G., KOZLOV, M. M. & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 2012. Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophys J*, 102, 2309-2320.
- ELIA, N., SOUGRAT, R., SPURLIN, T. A., HURLEY, J. H. & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 2011. Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 4846-4851.
- ETTINGER, A. W., WILSCH-BRAUNINGER, M., MARZESCO, A. M., BICKLE, M., LOHMANN, A., MALIGA, Z., KARBANOVA, J., CORBEIL, D., HYMAN, A. A. & HUTTNER, W. B. 2011. Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat Commun*, 2, 503.
- FAZELI, G., TRINKWALDER, M., IRMISCH, L. & WEHMAN, A. M. 2016. C. elegans midbodies are released, phagocytosed and undergo LC3-dependent degradation independent of macroautophagy. *J Cell Sci*, 129, 3721-3731.
- FERNANDEZ-ALVAREZ, A. & COOPER, J. P. 2017. Chromosomes orchestrate their own liberation: nuclear envelope disassembly. *Trends Cell Biol*, 27, 255-265.
- FLEMING, E. S., ZAJAC, M., MOSCHENROSS, D. M., MONTROSE, D. C., ROSENBERG, D. W., COWAN, A. E. & TIRNAUER, J. S. 2007. Planar spindle orientation and asymmetric cytokinesis in the mouse small intestine. *J Histochem Cytochem*, 55, 1173-1180.
- FLEMMING, W. 1891. Neue beiträge zur kenntniss der zelle. II. Theil. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 37, 685-751.
- FREMONT, S. & ECHARD, A. 2017. Studying cytokinesis and midbody remnants using correlative light/ scanning EM. *Methods Cell Biol*, 137, 239-251.
- FREMONT, S. & ECHARD, A. 2018. Membrane traffic in the late steps of cytokinesis. *Curr Biol*, 28, R458-R470.
- FREMONT, S., HAMMICH, H., BAI, J., WIOLAND, H., KLINKERT, K., ROCANCOURT, M., KIKUTI, C., STROEBEL, D., ROMET-LEMONNE, G., PYLYPENKO, O., HOUDUSSE, A. & ECHARD, A. 2017. Oxidation of F-actin controls the terminal steps of cytokinesis. *Nat Commun*, 8, 14528.
- GATTA, A. T. & CARLTON, J. G. 2019. The ESCRT-machinery: closing holes and expanding roles. *Curr Opin Cell Biol*, 59, 121-132.
- GERDES, J. M., DAVIS, E. E. & KATSANIS, N. 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*, 137, 32-45.

- GOLIAND, I., ADAR-LEVOR, S., SEGAL, I., NACHMIAS, D., DADOSH, T., KOZLOV, M. M. & ELIA, N. 2018. Resolving ESCRT-III spirals at the intercellular bridge of dividing cells using 3D STORM. *Cell Rep*, 24, 1756-1764.
- GU, M., LAJOIE, D., CHEN, O. S., VON APPEN, A., LADINSKY, M. S., REDD, M. J., NIKOLOVA, L., BJORKMAN, P. J., SUNDQUIST, W. I., ULLMAN, K. S. & FROST, A. 2017. LEM2 recruits CHMP7 for ESCRT-mediated nuclear envelope closure in fission yeast and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E2166-E2175.
- GUIZETTI, J., SCHERMELLEH, L., MANTLER, J., MAAR, S., POSER, I., LEONHARDT, H., MULLER-REICHERT, T. & GERLICH, D. W. 2011. Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science*, 331, 1616-1620.
- HANSON, P. I., ROTH, R., LIN, Y. & HEUSER, J. E. 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol*, 180, 389-402.
- HU, C. K., COUGHLIN, M. & MITCHISON, T. J. 2012. Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 23, 1024-1034.
- ISHIKAWA, H. & MARSHALL, W. F. 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 222-234.
- JIMENEZ, A. J., MAIURI, P., LAFAURIE-JANVORE, J., DIVOUX, S., PIEL, M. & PEREZ, F. 2014. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, 343, 1247136.
- KARASMANIS, E. P., HWANG, D., NAKOS, K., BOWEN, J. R., ANGELIS, D. & SPILIOTIS, E. T. 2019. A septin double ring controls the spatiotemporal organization of the ESCRT machinery in cytokinetic abscission. *Curr Biol*, 29, 2174-2182.
- KATSEN-GLOBA, A., PUETZ, N., GEPP, M. M., NEUBAUER, J. C. & ZIMMERMANN, H. 2016. Study of SEM preparation artefacts with correlative microscopy: Cell shrinkage of adherent cells by HMDS-drying. *Scanning*, 38, 625-633.
- KATZMANN, D. J., BABST, M. & EMR, S. D. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106, 145-155.
- KUO, T. C., CHEN, C. T., BARON, D., ONDER, T. T., LOEWER, S., ALMEIDA, S., WEISMANN, C. M., XU, P., HOUGHTON, J. M., GAO, F. B., DALEY, G. Q. & DOXSEY, S. 2011. Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat Cell Biol*, 13, 1214-1223.
- LAFAURIE-JANVORE, J., MAIURI, P., WANG, I., PINOT, M., MANNEVILLE, J. B., BETZ, T., BALLAND, M. & PIEL, M. 2013. ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge. *Science*, 339, 1625-1629.
- LEE, I. H., KAI, H., CARLSON, L. A., GROVES, J. T. & HURLEY, J. H. 2015. Negative membrane curvature catalyzes nucleation of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-III assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 15892-15897.

- LI, D., MANGAN, A., CICCHINI, L., MARGOLIS, B. & PREKERIS, R. 2014. FIP5 phosphorylation during mitosis regulates apical trafficking and lumenogenesis. *EMBO Rep*, 15, 428-437.
- LONCLE, N., AGROMAYOR, M., MARTIN-SERRANO, J. & WILLIAMS, D. W. 2015. An ESCRT module is required for neuron pruning. *Sci Rep*, 5, 8461.
- LUJAN, P., RUBIO, T., VARSANO, G. & KOHN, M. 2017. Keep it on the edge: The post-mitotic midbody as a polarity signal unit. *Commun Integr Biol*, 10, e1338990.
- LUJAN, P., VARSANO, G., RUBIO, T., HENNRICH, M. L., SACHSENHEIMER, T., GALVEZ-SANTISTEBAN, M., MARTIN-BELMONTE, F., GAVIN, A. C., BRUGGER, B. & KOHN, M. 2016. PRL-3 disrupts epithelial architecture by altering the post-mitotic midbody position. *J Cell Sci*, 129, 4130-4142.
- MAITY, S., CAILLAT, C., MIGUET, N., SULBARAN, G., EFFANTIN, G., SCHOEHN, G., ROOS, W. H. & WEISSENHORN, W. 2019. VPS4 triggers constriction and cleavage of ESCRT-III helical filaments. *Sci Adv*, 5, eaau7198.
- MARTIN-SERRANO, J. & MARSH, M. 2007. ALIX catches HIV. *Cell Host Microbe*, 1, 5-7.
- MARTIN-SERRANO, J., ZANG, T. & BIENIASZ, P. D. 2003. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol*, 77, 4794-4804.
- MARZESCO, A. M., JANICH, P., WILSCH-BRAUNINGER, M., DUBREUIL, V., LANGENFELD, K., CORBEIL, D. & HUTTNER, W. B. 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*, 118, 2849-2858.
- MCINTOSH, J. R. 2017. Assessing the contributions of motor enzymes and microtubule dynamics to mitotic chromosome motions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 33, 1-22.
- MIERZWA, B. & GERLICH, D. W. 2014. Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev Cell*, 31, 525-538.
- MIERZWA, B. E., CHIARUTTINI, N., REDONDO-MORATA, L., VON FILSECK, J. M., KONIG, J., LARIOS, J., POSER, I., MULLER-REICHERT, T., SCHEURING, S., ROUX, A. & GERLICH, D. W. 2017. Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 19, 787-798.
- MISHIMA, M. 2016. Centralspindlin in Rappaport's cleavage signaling. *Semin Cell Dev Biol*, 53, 45-56.
- MORITA, E., COLF, L. A., KARREN, M. A., SANDRIN, V., RODESCH, C. K. & SUNDQUIST, W. I. 2010. Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12889-12894.
- MULLINS, J. M. & BIESELE, J. J. 1977. Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol*, 73, 672-684.
- OLMOS, Y., HODGSON, L., MANTELL, J., VERKADE, P. & CARLTON, J. G. 2015. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature*, 522, 236-239.
- OTT, C., NACHMIAS, D., ADAR, S., JARNIK, M., SHERMAN, S., BIRNBAUM, R. Y., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & ELIA, N. 2018. VPS4 is a dynamic component of

- the centrosome that regulates centrosome localization of gamma-tubulin, centriolar satellite stability and ciliogenesis. *Sci Rep*, 8, 3353.
- OU, G., GENTILI, C. & GONCZY, P. 2014. Stereotyped distribution of midbody remnants in early *C. elegans* embryos requires cell death genes and is dispensable for development. *Cell Res*, 24, 251-253.
- PETERMAN, E., GIBIEZA, P., SCHAFER, J., SKEBERDIS, V. A., KAUPINIS, A., VALIUS, M., HEILIGENSTEIN, X., HURBAIN, I., RAPOSO, G. & PREKERIS, R. 2019. The post-abscission midbody is an intracellular signaling organelle that regulates cell proliferation. *Nat Commun*, 10, 3181.
- PETRY, S. 2016. Mechanisms of mitotic spindle assembly. *Annu Rev Biochem*, 85, 659-683.
- PETSALAKI, E. & ZACHOS, G. 2016. Clks 1, 2 and 4 prevent chromatin breakage by regulating the Aurora B-dependent abscission checkpoint. *Nat Commun*, 7, 11451.
- PETSALAKI, E. & ZACHOS, G. 2018. CHMP4C: A novel regulator of the mitotic spindle checkpoint. *Mol Cell Oncol*, 5, e1445944.
- PETSALAKI, E. & ZACHOS, G. 2019. Building bridges between chromosomes: novel insights into the abscission checkpoint. *Cell Mol Life Sci*.
- PIPER, R. C. & KATZMANN, D. J. 2007. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 519-547.
- POLLARD, T. D. & O'SHAUGHNESSY, B. 2019. Molecular Mechanism of Cytokinesis. *Annu Rev Biochem*, 88, 661-689.
- POLLAROLO, G., SCHULZ, J. G., MUNCK, S. & DOTTI, C. G. 2011. Cytokinesis remnants define first neuronal asymmetry in vivo. *Nat Neurosci*, 14, 1525-1533.
- REINSCH, S. & KARSENTI, E. 1994. Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized MDCKII cells. *J Cell Biol*, 126, 1509-1526.
- RODRIGUEZ-BOULAN, E., KREITZER, G. & MUSCH, A. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 233-247.
- SADLER, J. B. A., WENZEL, D. M., WILLIAMS, L. K., GUINDO-MARTINEZ, M., ALAM, S. L., MERCADER, J. M., TORRENTS, D., ULLMAN, K. S., SUNDQUIST, W. I. & MARTIN-SERRANO, J. 2018. A cancer-associated polymorphism in ESCRT-III disrupts the abscission checkpoint and promotes genome instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E8900-E8908.
- SADOUL, R., LAPORTE, M. H., CHASSEFEYRE, R., CHI, K. I., GOLDBERG, Y., CHATELLARD, C., HEMMING, F. J. & FRABOULET, S. 2018. The role of ESCRT during development and functioning of the nervous system. *Semin Cell Dev Biol*, 74, 40-49.
- SALA, C. & SEGAL, M. 2014. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, 94, 141-188.
- SAURIN, A. T., DURGAN, J., CAMERON, A. J., FAISAL, A., MARBER, M. S. & PARKER, P. J. 2008. The regulated assembly of a PKCepsilon complex controls the completion of cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 10, 891-901.

- SCHELLHAUS, A. K., DE MAGISTRIS, P. & ANTONIN, W. 2016. Nuclear Reformation at the End of Mitosis. *J Mol Biol*, 428, 1962-1985.
- SCHIEL, J. A., SIMON, G. C., ZAHARRIS, C., WEISZ, J., CASTLE, D., WU, C. C. & PREKERIS, R. 2012. FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 14, 1068-1078.
- SCHONEBERG, J., LEE, I. H., IWASA, J. H. & HURLEY, J. H. 2017. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 5-17.
- SCHONEBERG, J., PAVLIN, M. R., YAN, S., RIGHINI, M., LEE, I. H., CARLSON, L. A., BAHRAMI, A. H., GOLDMAN, D. H., REN, X., HUMMER, G., BUSTAMANTE, C. & HURLEY, J. H. 2018. ATP-dependent force generation and membrane scission by ESCRT-III and Vps4. *Science*, 362, 1423-1428.
- SHERMAN, S., KIRCHENBUECHLER, D., NACHMIAS, D., TAMIR, A., WERNER, S., ELBAUM, M. & ELIA, N. 2016. Resolving new ultrastructural features of cytokinetic abscission with soft-X-ray cryo-tomography. *Sci Rep*, 6, 27629.
- SINGLA, V. & REITER, J. F. 2006. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science*, 313, 629-633.
- SKOP, A. R., LIU, H., YATES, J., 3RD, MEYER, B. J. & HEALD, R. 2004. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science*, 305, 61-66.
- SPIRA, F., CUYLEN-HAERING, S., MEHTA, S., SAMWER, M., REVERSAT, A., VERMA, A., OLDENBOURG, R., SIXT, M. & GERLICH, D. W. 2017. Cytokinesis in vertebrate cells initiates by contraction of an equatorial actomyosin network composed of randomly oriented filaments. *Elife*, 6, e30867.
- STEIGEMANN, P., WURZENBERGER, C., SCHMITZ, M. H., HELD, M., GUIZETTI, J., MAAR, S. & GERLICH, D. W. 2009. Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell*, 136, 473-484.
- THORESEN, S. B., CAMPSTEIJN, C., VIETRI, M., SCHINK, K. O., LIESTOL, K., ANDERSEN, J. S., RAIBORG, C. & STENMARK, H. 2014. ANCHR mediates Aurora-B-dependent abscission checkpoint control through retention of VPS4. *Nat Cell Biol*, 16, 550-560.
- VENTIMIGLIA, L. N., CUESTA-GEIJO, M. A., MARTINELLI, N., CABALLE, A., MACHEBOEUF, P., MIGUET, N., PARNHAM, I. M., OLMOS, Y., CARLTON, J. G., WEISSENHORN, W. & MARTIN-SERRANO, J. 2018. CC2D1B coordinates ESCRT-III activity during the mitotic reformation of the nuclear envelope. *Dev Cell*, 47, 547-563.
- VIETRI, M., SCHINK, K. O., CAMPSTEIJN, C., WEGNER, C. S., SCHULTZ, S. W., CHRIST, L., THORESEN, S. B., BRECH, A., RAIBORG, C. & STENMARK, H. 2015. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature*, 522, 231-235.
- VUKUSIC, K., BUDA, R. & TOLIC, I. M. 2019. Force-generating mechanisms of anaphase in human cells. *J Cell Sci*, 132.
- WANG, K., WLOKA, C. & BI, E. 2019. Non-muscle Myosin-II is required for the generation of a constriction site for subsequent abscission. *iScience*, 13, 69-81.

- WHITE, E. A. & GLOTZER, M. 2012. Centralspindlin: at the heart of cytokinesis. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69, 882-892.
- WUHRER, R. & MORAN, K. 2016. Low voltage imaging and X-ray microanalysis in the SEM: challenges and opportunities. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 109, 012019.
- YANG, D., RISMANCHI, N., RENVOISE, B., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., BLACKSTONE, C. & HURLEY, J. H. 2008. Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 1278-1286.
- ZHAO, W. M., SEKI, A. & FANG, G. 2006. Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 17, 3881-96.